

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 66/D3C/2019

N° de série : 07/BA/2019



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Physiotoxicologie Cellulaire

Présentée et soutenu par :

BEKHOUCHE Khadidja

Intitulé

L'effet protecteur des extraits des plantes (*Perralderia coronopifolia* et *Gaillonia reboudiana*) vis-à-vis d'une toxicité provoquée par le pentachlorophénol.

Membres du jury :

Président: Laalaoui Korichi	Professeur	Université Frères Mentouri Constantine.
Directrice de thèse: Zama Djamila	Professeure	Université Frères Mentouri Constantine.
Examineur: Demirtas Ibrahim	Professeur	University Çankırı Karatekin Turkey.
Examinatrice: Dahamna Saliha	Professeure	Université Ferhat Abbas Sétif 1.
Examinatrice: Ameddah Souad	Professeure	Université Frères Mentouri Constantine.

Année Universitaire 2018-2019

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma très chère mère ***Kassah-Laouar Massika***, Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices. Puisse Dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et Bonheur.

Mon très cher père ***BEKHOUCHE Belkacem***, Tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme. En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières. Pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous de vos efforts. En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Puisse Dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur.

Mes anges, ma raison de vivre, mes enfants, ***Takoua et Firas***, Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer l'amour... Bref, vous êtes la joie de ma vie. J'espère que ma thèse sera pour vous source de fierté et qu'elle sera un exemple à suivre. Votre joie de vivre et votre sourire ont été pour moi le meilleur encouragement que je puisse avoir. Que DIEU vous garde et vous protège.

Mes frères et sœurs, ***Antar, Abdelkader, Zakaria, Radhia, Soumia, Amina et pareillement*** à mes nièces et mes neveux. Je ne pourrais d'aucune manière exprimer ma profonde affection et mon immense gratitude pour tous les sacrifices consentis, votre aide et votre générosité extrêmes ont été pour moi une source de courage, de confiance et de patience. J'implore DIEU qu'il vous apporte bonheur, amour et que vos rêves se réalisent.

La mémoire de ***mes grands-parents et mon amie Zayneb***, Que vous reposiez dans le paradis du seigneur.

Mes amies ***Abed Hadjer, Ghamit Bouchra, Meriem, Yasmine, Karima, Essebti, Zid Hassiba et Kermiche Hanane***, Je prie DIEU pour que notre amitié et fraternité soient éternelles.

Remerciements

Je remercie en premier lieu **ALLAH** le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de cette thèse.

Merci :

A mon encadreur, **Professeure ZAMA Djamila**,

Au niveau du département de biologie animale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université Frères Mentouri Constantine1.

Nous avons eu la chance et le privilège de travailler sous votre direction, de profiter de votre culture scientifique, vos compétences professionnelles incontestables ainsi que vos qualités humaines qui vous valent l'admiration et le respect. Puissent des générations et des générations avoir la chance de profiter de votre savoir qui n'a d'égal que votre sagesse et votre bonté. Veuillez, Chère professeure, trouvé dans ce modeste travail l'expression de notre haute considération et notre profond respect pour avoir guidé les premiers pas de ma carrière.

A notre maître et juge de thèse, **professeur LALAOUI Koriechi**

Au niveau du Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université Frères Mentouri Constantine1.

Notre profonde reconnaissance est adressée à vous Monsieur, pour l'honneur que vous nous avez fait d'accepter de présider le jury de cette thèse. Merci également pour votre contribution dans la réalisation de ce travail.

Au **Professeur DEMIRTAS Ibrahim**

Au niveau du Laboratoire de recherche sur les plantes, Département de Chimie, Université de Cankiri Karatekin, Turquie.

Nous vous remercions pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. C'est avec sincérité que nous vous exprimons notre admiration pour le professeur, mais aussi pour l'homme que vous êtes. Nous avons pu, au cours des stages d'externe passés sous votre direction, apprécier vos qualités humaines, votre savoir-faire et vos compétences scientifiques. Veuillez trouver dans ce travail, Cher Maître, l'expression de notre estime et de notre considération.

Au professeure DHAMNA Saliha

Au niveau du Département de Biologie et Physiologie Animale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas, Sétif 1.

Nous sommes particulièrement touchés par la gentillesse avec laquelle vous avez bien voulu accepter de juger ce travail. Merci pour vos encouragements et votre disponibilité sans réserve.

Au Professeure AMEDDAH Souad

Au niveau du Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences de la Nature de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1.

Nous avons l'honneur de votre participation et votre examination de ce travail. Merci pour vos encouragements et votre disponibilité sans réserve.

Au Professeurs BENAYACHE Samir et BENAYACHE Fadila

Au niveau de l'Unité de Recherche et Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives, Analyses Physico-Chimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Frères Mentouri, Constantine 1.

Nous espérons être dignes de votre confiance, et nous prions, chers professeurs, d'accepter notre profonde reconnaissance et notre haute considération.

Au Professeur OZEN Tefvik

Au niveau du Département de chimie, Faculté des sciences et des arts, Université Ondokuz Mayas, Samsun, Turquie.

Permettez-nous, Cher Maître de vous exprimer notre profond respect et notre sincère gratitude. Nous avons eu le privilège de travailler sous votre direction et avons trouvé auprès de vous le guide et le conseiller qui nous a reçues en toutes circonstances avec sympathie, sourire et bienveillance. Votre parcours professionnel, votre compétence incontestable, votre charisme et vos qualités humaines font de vous un grand professeur et nous inspirent une grande admiration et un profond respect.

Au Docteur KOUT Mounir

Au niveau du Laboratoire de cytologie anatomique et pathologique, Centre hospitalier universitaire. (CHU) Constantine.

Votre probité au travail et votre dynamisme, votre sens de responsabilité nous ont toujours impressionnés et sont pour nous un idéal à atteindre.

*Au Docteurs **AMRANI Amel** et **BOUBEKRI Nassima***

Au niveau du Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de Mentouri Constantine1.

Un grand merci pour votre soutien, votre aide, votre encouragement et votre disponibilité sans réserve.

*Au Docteurs, **Serkan KOLDAS**, **Fatih GUL**, **Ayşe Sahin YAGLIOGLU**, **Semiha YENIGUN** et **kemal YILDIRIM**.*

Au niveau de l'Université de Cankiri, Karatekin et l'Université Ondokuz Mayas, Samsun, Turquie.

Mes plus sincères remerciements pour vous ma deuxième famille, pour vos encouragements et votre gentillesse au quotidien.

*Au docteur **BELBEL Abed Elghani***

Nous avons la chance de profiter de votre savoir qui n'a d'égal que votre sagesse et votre bonté. Un grand merci monsieur pour votre aide et votre encouragement.

*Au **Chef et Personnel** du*

Laboratoire d'Analyses Biologique au niveau de L'Hôpital Militaire Universitaire d'Ali Mendjli, Constantine.

Un grand merci pour votre soutien, vos encouragements et votre aide.

Merci à tous ...

À propos de cette étude

Cette étude a été financée par des subventions du Ministère algérien de l'enseignement supérieur. En plus, ce travail a été soutenu par les subventions de l'Organisation turque de planification de l'État (DPT2010K120720), de l'Université Çankırı Karatekin (Projet BAP: FF080515B30), du Conseil de Recherche Scientifique et Technologique de Turquie (TUBITAK, 114Z683) et de l'Université Ondokuz Mayıs (Projet BAP: PYO.FEN.1904.13.003).

Communications et publications

Une grande partie de ce travail a été présentée sous forme de communications dans différents congrès et a fait l'objet de publications internationales.

➤ *Publications*

- **Bekhouche K**, Ozen T, Boussaha S, Koldan K, Yenigun S, Lassed S, Demirtas I, Benayache F, Benayache S, Zama D. (2018). **Anti-oxidant, DNA-damage protection and anti-cancer properties of *n*-butanol extract of the endemic *Perralderia coronopifolia***. Bangladesh J Pharmacol; 13: 82-89.
- Boussaha S, **Bekhouche K**, Boudjerda A, León F, Koldaş S, Yaglioglu A S, Demirtaş I, Brouard I, Marchioni E, Zama D, Benayache S and Benayache F. (2015). **Chemical Constituents, in vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Perralderia coronopifolia* Coss. subsp. eu-coronopifolia M. var. typica M. extract**. Rec. Nat. Prod. 9:3 (2015) 312- 322.
- **Khadidja Bekhouche**, Tefvik Ozen, Sara Boussaha, Ibrahim Demirtas, Mounir Kout, Kemal Yildirim, Djamila Zama, Fadila Benayache, Samir Benayache. **Hepatoprotective effects of the *n*-butanol extract from *Perralderia coronopifolia* Coss. against PCP-induced toxicity in Wistar Albinos rats**. En cours d'édition.

➤ *Communication par affiche*

- **Bekhouche K**, Boussaha S, kout M, Ozen T, Demirtas I, Benayache F, Benayache S , Zama D. **Hepatoprotective effects of the *n*-butanol extract from: *Perralderia sp.* against PCP-induced toxicity in Wister Albinos rats**. Séminaire National Environnement et Toxicologie (snextox2019), 18 - 19 janvier 2019. Constantine, Algérie.

- **Bekhouche K**, Boussaha S, Amrani A Boubekri N, Zama D, Benayache F, Benayache S, Demirtas I. ***In vitro* evaluation of the antioxidant activities in ethyl acetate extract from *perralderia coronopifolia* and methanol extract from *Gaillonia reboudiana***. I-International Organic Chemistry Congres, October 25th-29th, 2013. Sakarya, Turquie.
- **Bekhouche K**, Boussaha S , Belfarhi L, Amrani A, Boubekri N, Zama D, Benayache F, Benayache S. **Hepatoprotective role of *Gaillonia sp.* extract against PCP-induced toxicity in Wistar Albinos rats**. 11th. International Ethnobotany Symposio, November 2nd-5th, 2013. Antalya,Turquie.
- Boubekri N, Boukaabache R, Amrani A, **Bekhouche K**, Zama D, Boumaza O, Benayache F, Benayache S. **Hepatoprotective effect of *genista quadriflora* against ethanol induced toxicity**. 11th. International Ethnobotany Symposio, November 2nd-5th, 2013. Antalya,Turquie.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des images

Introduction..... 01

Première partie : synthèse bibliographique

I. Les pesticides	04
II. Le pentachlorophénol (PCP)	05
1. Devenir de PCP	06
2. Toxicocinétique.....	08
3. Types de toxicité	11
III. PCP et le stress oxydatif	12
1. Mécanismes de la toxicité du PCP	13
1.1.Au niveau microsomal	14
1.2.Au niveau de la mitochondrial	15
1.3.Au niveau de l'AND, de peptides et de protéines	17
2. Effets de PCP sur la santé	21
1.1.Effets génétique, mutagènes, cancérogènes	22
1.2.Effets sur le système endocrinien et la reproduction	22
1.3.Effets hépatiques, rénaux et respiratoires	22
1.4.Effets hématologiques, cardiovasculaires et neurologiques	23
3. Méthodes d'évaluation du stress oxydant	24
IV. La phytothérapie	24
1. Les polyphénols	25

1.1 Propriété	25
1.2 Biosynthèse des polyphénols.....	26
1.3 Classification des polyphénols	27
2. Les flavonoïdes	28
2.1 Caractéristiques	28
2.2 Biosynthèse des flavonoïdes	30
3. Absorption et métabolisme de polyphénols et de flavonoïdes	31
4. Effets de polyphénols chez le consommateur	33
4.1 Effet anticancéreux	34
4.2 Effet antioxydant	34
4.3 Effet hépato-protecteur et détoxifiant des xénobiotiques (pesticides)	35

Deuxième partie : Etudes expérimentales

1- Etude expérimentale de la plante :*Perralderia coronopifolia* Coss

I. Matériel et méthodes.....	38
1. Matériel végétal	38
1.1.Classification systématique de la plante.....	38
1.2.Nom et usage traditionnels	38
1.3.Situation	38
1.4.Description	38
1.5.Récolte	39
1.6.Extraction	39
1.7. Composition	40
2. Animaux	40
3. Tests <i>in vitro</i>.....	40
3.1.Propriétés antioxydantes	40
3.1.1. Détermination des teneurs totales en composés phénoliques et flavonoïdes	40

3.1.2. Détermination de l'activité antioxydante totale	41
3.1.3. Détermination de la puissance réductrice.....	41
3.1.4. Détermination de l'activité de piégeage H ₂ O ₂	41
3.1.5. Détermination de l'activité de chélation de métaux	42
3.1.6. Détermination de l'activité de piégeage de DPPH'	42
3.1.7. Détermination de Piégeage du radical hydroxyle (OH').....	42
3.1.8. Détermination de l'efficacité d'inhibition de la peroxydation lipidique (LPO).....	43
3.2.Détermination de l'efficacité d'inhibition des dommages de l'ADN	44
3.3.Activité antiproliférative	54
3.3.1. Préparation de culture	44
3.3.2. Détermination de l'activité antiproliférative par le système xCELLigence.....	44
3.3.3. Test de prolifération cellulaire : ELISA-BrdUProlifération cellulaire	45
3.3.4. Test de fuite du lactate déshydrogénase (LDH)	46
4. Tests <i>in vivo</i>.....	46
4.1.Traitement des animaux	46
4.2.Dissection des rattes, prélèvement du sang et préparation des homogénats tissulaires	47
4.3.Evaluation du MDA dans homogénats du foie, rein et cœur	47
4.4.Evaluation du glutathion dans le foie, le rein et le cœur	48
4.5.Évaluation de l'activité GPx dans le foie, le rein et le cœur	48
4.6.Dosage de paramètres biochimiques.....	48
5. Analyse statistique	48
II. Résultats et discussion	49
1. Tests <i>in vitro</i>.....	49
1.1.Les propriétés antioxydantes	49
1.1.1. Contenu des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes	49
1.1.2. Activité antioxydante totale	50
1.1.3. Puissance réductrice	50
1.1.4. Activité de piégeage de H ₂ O ₂	51
1.1.5. Activité chélatante des métaux	52
1.1.6. Activité de piégeage de DPPH'	52
1.1.7. Piégeage du radical hydroxyle (OH')	54

1.1.8. Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique	56
1.2.Efficacité d'inhibition des dommages à l'ADN	57
1.3.Propriétés anticancéreuses	58
1.3.1. Activité antiproliférative (par le système exCELLigence)	58
1.3.2. Prolifération cellulaire (par ELISA-BrdUProlifération cellulaire)	61
1.3.3. Effet cytotoxique	64
2. Tests <i>in vivo</i>.....	64
2.1.Effet des traitements sur le taux du MDA dans foie, le rein et le cœur	64
2.2.Effet des traitements sur le taux du glutathion dans le foie, le rein et le cœur	66
2.3.Effet des traitements sur l'activité de GPx dans le foie, le rein et le cœur	68
2.4.Résultats de dosage de paramètres biochimiques	70
2.5.Evaluation de poids corporels des animaux	71
III. Conclusion.....	72

2- Etude expérimentale de la plante: *Gaillonia reboudiana* Coss.

I. Matériel et méthodes.....	74
1. Matériel végétal.....	74
1.1.Classification systématique de la plante	74
1.2.Nom traditionnel	74
1.3.Situation	74
1.4.Description	74
1.5.Récolte	75
1.6.Extraction	75
2. Animaux	76
3. Les tests <i>in vitro</i> (comme décrit dans l'étude expérimentale 1).....	76
4. Les tests <i>in vivo</i> (comme décrit dans l'étude expérimentale 1).....	76
4.1.Traitement des animaux	76
II. Résultats et discussion.....	77
1. Tests <i>in vitro</i>	77
1.1.Propriétés antioxydantes	77
1.1.1. Contenu des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes	78

1.1.2. Activité antioxydante totale	78
1.1.3. Puissance réductrice	79
1.1.4. Activité de piégeage de H ₂ O ₂	79
1.1.5. Activité chélatante des métaux	80
1.1.6. Activité de piégeage de DPPH'.....	80
1.1.7. Piégeage du radical hydroxyle (OH')	82
1.1.8. Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique	84
1.2.Efficacité d'inhibition des dommages à l'ADN	85
1.3.Propriétés anticancéreuses	86
1.3.1. Activité anticancéreuse (par le système exCELLigence)	86
1.3.2. Activité antiprolifératif (par ELISA-BrdUProlifération cellulaire)	87
1.3.3. Effet cytotoxique	90
2. Tests <i>in vivo</i>.....	91
2.1.Effet sur le taux du MDA dans le foie, le rein et le cœur	91
2.2.Effet sur le taux du GSH dans le foie, le rein et le cœur	93
2.3.Éffet sur l'activité de GPx dans le foie, le rein et le cœur	95
2.4.Résultats de dosage de paramètres biochimiques.....	97
2.5.Evaluation de poids corporels des animaux	98
III. Conclusion.....	99

3 - Etude histologique

1. Etude histologique	101
2. Résultats	101
2.1.Etude histologique des coupes de foies.....	101
2.2.Etude histologique des coupes de reins	101
2.3.Etude histologique des coupes de cœurs	102

4 - Discussion

Discussion des résultats <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> : les effets protecteurs des deux plantes <i>P. coronopifolia</i> et <i>G.reboudiana</i>	111
---	-----

Conclusion générale	124
Abstract of thesis (la thèse en anglais)	126
Références bibliographiques	237

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
5-FU	5-fluorouracile
8-OHdG	8-oxodeoxyguanosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acides gras polyinsaturés
ALT	Glutamate pyruvate transaminases
AST	Glutamates oxaloacétate transaminases
ATP	Adénosine triphosphate
BHA	Hydroxyanisole butylé
BSA	Bovine serum albumin
C ₀	ADN non irradié non traité
C3G	Anthocyanines cyanidin-3-O- β -glucoside
C6	Rat brain tumor
CAR	Récepteur constitutif de l'androstane
CE	Communauté européenne
C _R	ADN non irradié aux UV
CYP	Cytochrome
DMEM-HG	Milieu d'aigle modifié de Dulbecco
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DTNB	Acide 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoïque)

EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
ERN	Espèces Réactives de l'Azote
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
EtOAc-PC	Extrait éthyle d'acétate de la plante <i>P. Coronopifolia</i>
FBS	Sérum fœtal bovin
Gclc	Glutamate-cystéine ligase catalytique
GEA	Equivalent acide gallique
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydée
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HeLa	Human cervix carcinoma
IC ₅₀	La demi concentration inhibitrice
LDH	Lactate déshydrogénase
LO [·]	Alcoxyle
LO ₂ [·]	Radicaux peroxy
LPO	Peroxydation lipidique
MDA	Malondialdéhyde
MeOH-GR	Extrait methanolique de la plante <i>G. Reboudiana</i>

NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
<i>n</i> -BuOH-PC	Extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>P. Coronopifolia</i>
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OH [·]	Radical hydroxyle
PCP	Pentachlorophénole
PMF	Force motrice protonique
PXR	Récepteur nucléaire sensible aux xénobiotiques
QE	Equivalents de quercétine
RO ₂ [·]	Radical pyroxyde
RTCA-SP	Real Time Cell analyzersingle Plate
SDM	Déviation standard de la moyenne
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
T3	3, 3', 5-triiodothyronine
T4	Thyroxine
TBA	Thiobarbiturique acide
TBARS	Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique
TCA	Acide trichloracétique
TCHQ	Tetrachloro- <i>p</i> -hydroquinone
UCP	Uncoupling Protein

Liste des figures

Figures	Pages
Figure 1: Dégradation aérobie et anaérobie du pentachlorophénol	08
Figure 2 : voies métaboliques du pentachlorophénol	10
Figure 3 : Production des EROs au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale	15
Figure 4 : Activation du transport par l'ion superoxyde via les UCP (UnCoupling Proteins)	17
Figure 5 : Formation des EROs et induction des dommages des composants cellulaires : l'ADN, les lipides et les protéines	19
Figure 6 : Effets des pesticides sur la mitochondrie et conséquences au niveau cellulaire	20
Figure 7 : Représentation des principaux groupes des flavonoïdes	30
Figure 8 : Biosynthèse des Flavonoïdes	31
Figure 9 : Voies d'absorption et de métabolisme des polyphénols alimentaires et de leurs dérivés chez l'homme	33
Figure 10: Intérêt des composés bioactifs et polyphénols dans la détoxification des xénobiotiques	37
Figure 11 : Teneur des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et <i>n</i> -butanol (<i>n</i> -BuOH-PC) de la plante <i>P. coronopifolia</i> en phénols et flavonoïdes	49
Figure 12 : Courbes représentant le % d'inhibition du DPPH [·] des extraits d'acétate d'éthyle(EtOAc-PC) et <i>n</i> -butanol (<i>n</i> -BuOH-PC) de la plante <i>P. coronopifolia</i> ainsi que de la vitamine C (standard antioxydant) en fonction de la concentration	53
Figure 13: Valeurs d'IC ₅₀ des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et <i>n</i> -butanol (<i>n</i> -BuOH-PC) de la plante <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine C vis-à-vis le piégeage du radical DPPH [·]	54
Figure 14 : Activité anti-radicalaire du radical hydroxyle (OH [·]) des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et <i>n</i> -butanol (<i>n</i> - BuOH-PC) de la plante <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine C (standard antioxydant)	55
Figure 15 : Valeurs de l'IC ₅₀ des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et <i>n</i> -butanol (<i>n</i> -BuOH-PC) de la plante <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine C vis-à-vis le piégeage de radical hydroxyle (OH [·])	55
Figure 16: Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (formation du MDA) des extraits acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et <i>n</i> -butanolique (<i>n</i> -BuOH-PC) de la plante <i>P. coronopifolia</i> ainsi que de la vitamine C (standard antioxydant)	56

Figure 17: Valeurs de l'IC ₅₀ des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et <i>n</i> -butanol (<i>n</i> -BuOH-PC) de la plante <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine C vis-à-vis l'inhibition de la peroxydation lipidique	57
Figure 18: Effet des deux extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et <i>n</i> -butanol (<i>n</i> -BuOH-PC) de la plante <i>P. coronopifolia</i> à la dose: 50 µg, contre les dommages oxydatifs de l'ADN plasmidique 46966 causés par la photolyse UV de H ₂ O ₂ (3%, v / v)	58
Figure 19 : Activité anticancéreuse de l'extrait acétate d'éthyle de <i>P. coronopifolia</i> (EtOAc-PC) contre la lignée cellulaire HeLa (2,5 x 10 ⁴ cellules / puits)	59
Figure 20: Activité anticancéreuse de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> (<i>n</i> -BuOH-PC) contre la lignée cellulaire HeLa (2,5 x 10 ⁴ cellules / puits)	59
Figure 21 : Activité anticancéreuse de 5-florourasil comme témoin positif contre la lignée cellulaire HeLa (2,5 x 10 ⁴ cellules / puits)	60
Figure 22 : Activité anticancéreuse de l'extrait acétate d'éthyle de <i>P. coronopifolia</i> (EtOAc-PC) contre la lignée cellulaire C6 (2,5 x 10 ⁴ cellules / puits)	60
Figure 23 : Activité anticancéreuse de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> (<i>n</i> -BuOH-PC) contre la lignée cellulaire C6 (2,5 x 10 ⁴ cellules / puits)	61
Figure 24 : Activité anticancéreuse de 5-florourasil comme témoin positif contre la lignée cellulaire C6 (2,5 x 10 ⁴ cellules / puits)	61
Figure 25 : Activité antiproliférative de l'extrait acétate d'éthyle de <i>P. coronopifolia</i> (EtOAc-PC) et de 5-FU contre la lignée cellulaire HeLa (3 x 10 ⁴ cellules / puits)	62
Figure 26 : Activité antiproliférative de l'extrait acétate d'éthyle de <i>P. coronopifolia</i> (EtOAc-PC) et de 5-FU contre la lignée cellulaire C6 (3 x 10 ⁴ cellules / puits)	63
Figure 27: Effet du PCP, de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique (MDA) dans les homogénats hépatiques	65
Figure 28: Effet du PCP, de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique (MDA) dans les homogénats des reins	65
Figure 29: Effet du PCP, de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique (MDA) dans l'homogénats des cœurs	66
Figure 30: Effet de la PCP, de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine E sur les niveaux de GSH dans les homogénats hépatiques	66
Figure 31: Effet de la PCP, de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine E sur les niveaux de GSH dans les homogénats des reins	67

Figure 32: Effet du PCP, de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine E sur les niveaux de GSH dans les homogénats de cœurs	68
Figure 33: Effet du PCP, de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine E sur l'activité du GPx dans les homogénats hépatiques	69
Figure 34: Effet du PCP, de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine E sur l'activité du GPx dans les homogénats de reins	69
Figure 35: Effet du PCP, de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine E sur l'activité du GPx dans les homogénats de cœurs	70
Figure 36: Effet du PCP, de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine E sur le poids des rats	72
Figure 37 : Teneur totale de l'extrait metanolique de la plante <i>G.reboudiana</i> (MeOH-GR) en phénols et flavonoïdes	78
Figure 38: Courbe représentant le % d'inhibition du DPPH [·] de la vitamine C (standard antioxydant) en fonction de la concentration	81
Figure 39: Courbe représentant le % d'inhibition du DPPH [·] de l'extrait metanolique de la plante <i>G.reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine C (standard antioxydant) en fonction de la concentration	81
Figure 40: Valeurs de l'IC50 d'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine C vis-à-vis le piégeage de radical DPPH [·]	82
Figure 41 : activité anti-radicalaire de radical hydroxyle (OH [·]) d'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine C (standard antioxydant)	83
Figure 42 : Valeurs de l'IC50 d'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine C vis-à-vis le piégeage de radical hydroxyle(OH [·])	83
Figure 43: activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (formation du MDA) d'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) ainsi que de la vitamine C (standard antioxydant)	84
Figure 44: Valeurs de l'IC50 d'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine C vis-à-vis l'inhibition de la peroxydation lipidique	85
Figure 45: Effet de l'extrait metanolique de la plante <i>G.reboudiana</i> (MeOH-GR) (50 µg) contre les dommages oxydatifs de l'ADN plasmidique 46966 causés par la photolyse UV de H ₂ O ₂	86
Figure 46 : Activité anticancéreuse de l'extrait metanolique de <i>G.reboudiana</i> (MeOH-GR) contre la lignée cellulaire HeLa (2,5 x 10 ⁴ cellules / puits)	87

Figure 47 : Activité anticancéreuse de 5-florourasil comme témoin positif contre la lignée cellulaire HeLa (2,5 x 10 ⁴ cellules / puits)	87
Figure 48 : Activité anticancéreuse de l'extrait metanolique de <i>Gailloniareboudiana</i> (MeOH-GR) contre la lignée cellulaire C6 (2,5 x 10 ⁴ cellules / puits)	88
Figure 49 : Activité anticancéreuse de 5-florourasil comme témoin positif contre la lignée cellulaire C6 (2,5 x 10 ⁴ cellules / puits)	88
Figure 50 : Activité antiproliférative de l'extrait metanolique de <i>G.reboudiana</i> (MeOH-GR) et de 5-FU contre la lignée cellulaire HeLa (3 x 10 ⁴ cellules / puits)	89
Figure 51 : Activité antiproliférative de l'extrait metanolique de <i>G.reboudiana</i> (MeOH-GR) et de 5-FU contre la lignée cellulaire C6 (3 x 10 ⁴ cellules / puits)	90
Figure 52: Effet du PCP, de l'extrait méthanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique dans les homogénats hépatiques	92
Figure 53 : Effet du PCP, de l'extrait méthanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique (MDA) dans les homogénats des reins	92
Figure 54 : Effet du PCP, de l'extrait méthanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique (MDA) dans les homogénats des cœurs	93
Figure 55 : Effet de la PCP, de l'extrait méthanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine E sur les niveaux de GSH dans les homogénats des foies	94
Figure 56 : Effet de la PCP, de l'extrait méthanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine E sur les niveaux de GSH dans les homogénats des reins	94
Figure 57 : Effet de la PCP, de l'extrait méthanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine E sur les niveaux de GSH dans les homogénats des cœurs	95
Figure 58 : Effet du PCP, de l'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine E sur l'activité enzymatique du GPx dans les homogénats hépatiques	96
Figure 59 : Effet du PCP, de l'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine E sur l'enzyme antioxydante (GPx) dans les homogénats des reins	96
Figure 60: Effet du PCP, de l'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine E sur l'enzyme antioxydante (GPx) dans les homogénats des cœurs	97

Figure 61: Effet du PCP, de l'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine E sur le poids des rattes.

99

Liste des Tableaux

Tableaux	Pages
Tableau 01: Classification des pesticides selon leur cible	05
Tableau 02 : Propriétés physico-chimiques du pentachlorophénol	06
Tableau 03: Les principales classes de composés phénoliques dans les plantes	28
Tableau 04: Classification systématique de la plante <i>P. coronopifolia</i> Coss	38
Tableau 05: Rendement des différents extraits des parties aériennes de <i>P. coronopifolia</i>	40
Tableau 06a : Activité antioxydante totale des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et <i>n</i> -butanol (<i>n</i> -BuOH-PC) de la plante <i>P. coronopifolia</i>	50
Tableau 06b : Pouvoir réducteur des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et <i>n</i> -butanol (<i>n</i> -BuOH-PC) de la plante <i>P. coronopifolia</i>	51
Tableau 06c: Piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et <i>n</i> -butanol (<i>n</i> -BuOH-PC) de la plante <i>P. coronopifolia</i>	51
Tableau 06d : Activité de chélation des métaux des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et <i>n</i> -butanol (<i>n</i> -BuOH-PC) de la plante <i>P. coronopifolia</i>	52
Tableau 07 : Valeurs IC ₅₀ et IC ₇₅ de l'extrait acétate d'éthyle de <i>P. coronopifolia</i> (EtOAc-PC) et de 5-fluorouracile, présenté par dosage antiprolifératif contre les lignées cellulaires HeLa et C6 (3 x 10 ³ cellules / mL)	63
Tableau 08 : Pourcentage de cytotoxicité des extraits d'éthyle d'acétate de la plante <i>P. coronopifolia</i> (EtOAc-PC) et le 5-FU présenté par le test de fuite du lactate déshydrogénase (LDH) contre la lignée cellulaire C6 (5 x 10 ³ cellules / mL)	64
Tableau 09 : Effet du PCP, de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>P. coronopifolia</i> et de la vitamine E sur des paramètres biochimiques (sériques) chez les rattes	71
Tableau 10 : Classification systématique de la plante <i>G. reboudiana</i> Coss	74
Tableau 11: Rendement des différents extraits des parties aériennes de <i>G. reboudiana</i>	75
Tableau 12a : Activité antioxydante totale de l'extrait méthanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR)	78
Tableau 12b: Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR)	79

Tableau 12c: Piégeage du peroxyde d'hydrogène de l'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR)	79
Tableau 12d: Activité de chélation des métaux de l'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR)	80
Tableau 13 : Valeurs IC50 et IC75 de l'extrait acétate d'éthyle de <i>P. coronopifolia</i> (EtOAc-PC), l'extrait metanolique de <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de 5-fluorouracile, présenté par dosage antiprolifératif contre les lignées cellulaires HeLa et C6 (3×10^3 cellules / mL).	90
Tableau 14 : Pourcentage de cytotoxicité de l'extrait metanolique de la plante <i>G.reboudiana</i> (MeOH-GR) et le 5-FU présenté par le test de fuite du lactate déshydrogénase (LDH) contre la lignée cellulaire C6 (5×10^3 cellules / mL).	91
Tableau 15: Effet du PCP, de l'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> (MeOH-GR) et de la vitamine E sur les paramètres biochimiques (sériques) des rattes	99

Liste des images

Image	Page
Image 01: Photomicrographie histologique du foie d'un rat témoin (X400)	103
Image 02: Photomicrographie histologique du foie d'un rat traité avec le PCP à la dose 20 mg/kg (X400)	103
Image 03: Photomicrographie histologique du foie traité avec l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> à la dose 50 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400)	104
Image 04: Photomicrographie histologique du foie traité avec la vitamine E à la dose 100 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400)	104
Image 05: Photomicrographie histologique du foie d'un rat traité avec l'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> à la dose 50 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400)	105
Image 06: Photomicrographie histologique du foie d'un rat traité avec l'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> à la dose 100 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400)	105
Image 07: Photomicrographie histologique du rein d'un rat témoin (X400)	106
Image 08: Photomicrographie histologique du rein d'un rat traité avec la vitamine E à la dose 100 mg/kg (X400)	106
Image 09: Photomicrographies histologiques du rein d'un rat traité avec le PCP à la dose 20 mg/kg (X400)	107
Image 10: Photomicrographie histologique du rein d'un rat traité avec l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> à la dose 50 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400)	108
Image 11: Photomicrographie histologique du rein d'un rat traité avec l'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> à la dose 100 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400)	108
Image 12: Photomicrographie histologique du cœur d'un rat témoin (X400)	109
Image 13: Photomicrographie histologique du cœur d'un rat traité avec le PCP à la dose 20 mg/kg (X400)	109
Image 14: Photomicrographie histologique du cœur d'un rat traité avec l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>P. coronopifolia</i> à la dose 50 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400)	109
Image 13: Photomicrographie histologique du rein d'un rat traité avec l'extrait metanolique de la plante <i>G. reboudiana</i> à la dose 100 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400)	110

La lutte chimique en utilisant les pesticides reste le moyen le plus utilisé pour protéger les cultures, les semences et les denrées stockées contre les organismes nuisibles. L'utilisation des pesticides a réalisé un progrès important afin de dominer des ravageurs, des maladies parasitaires et des mauvaises herbes en agriculture, autrement dit ; contre des organismes gênateurs. Ce genre de produits a permis une assurance appréciable de la production alimentaire.

Au début des années 60, beaucoup de recherches ont montré que les pesticides organochlorés ont des effets négatifs sur différents organismes vivants, qu'ils sont très persistants dans l'environnement, notamment dans les sols, et ont la possibilité de se bio-accumuler dans les chaînes trophiques (Montano et al., 2013 ; Peng et al., 2017).

Parmi les pesticides organochlorés les plus souvent utilisés, on distingue Le pentachlorophénol (PCP). C'est une substance organochlorée artificielle, préparée à partir de différents composants chimiques. Il est utilisé pour la fabrication des fongicides, insecticides, antiparasitaires ainsi que préservatif du bois (Dong et al., 2009).

L'interaction orale, par inhalation et par voie cutanée, pendant une courte ou longue période de contact avec le PCP, chez les humains et les animaux expérimentaux a fait connaître des effets plus ou moins nocifs sur la santé. Des études récentes ont montré que l'exposition au PCP peut entraîner des dommages oxydatifs et une détérioration des fonctions endocriniennes, respiratoires, hépatiques, rénales et du système nerveux central et reproducteur (Morgan et al., 2015 ; Peng et al., 2017). Le PCP pourrait exercer aussi des effets sur le système immunitaire et l'homéostasie thyroïdienne (Hurd et al., 2012 ; Yu et al., 2014).

D'autre part, l'utilisation des plantes médicinales par l'homme est une pratique antique. De nos jours la majorité des habitants utilisent de très nombreuses plantes, compte tenu de leurs propriétés aromatiques, comme remède en médecine traditionnelle. Cependant, cette utilisation ne se base sur aucun critère scientifique, elle tient compte simplement des observations au cours des siècles (Anderson, 2008 cité par Djebbari, 2017).

Toutefois, les plantes médicinales ont des propriétés antioxydantes potentielles qui peuvent contribuer à prévenir la formation de radicaux libres et les différentes pathologies. Les composés phénoliques et polyphénoliques ainsi que les flavonoïdes sont les composés actifs les plus importants avec ces propriétés (Sedighi et al., 2017).

Plusieurs études ont analysé l'effet protecteur de différentes plantes médicinales vis-à-vis d'une toxicité induite par les pesticides. Dans ce contexte, de nombreuses plantes médicinales ont été testées comme antioxydants afin de maîtriser le potentiel de l'effet nocif potentiel des radicaux libres et de réduire les dommages causés par les pesticides. A titre d'exemple, l'effet protecteur de l'extrait *n*-butanol de la plante *Paronychia argentea* (Zama et al., 2007), l'extrait méthanolique de

la plante *Punica granatum* (Agha et al., 2013), et l'extrait éthanolique de *Meconopsis integrifolia* (zhou et al., 2013).

Par conséquent, il y a un intérêt croissant pour utilisation des antioxydants naturels comme une stratégie de protection contre les problèmes hépatiques, cardio-vasculaires, rénaux et autres. Des expérimentations animales ont suggéré l'effet antioxydant et protecteur de certains extraits des plantes dans la toxicité induite par le PCP, attribué à l'énorme quantité de polyphénols. Les effets des extraits végétaux proviennent de leur composition en molécules bioactives comme les polyphénols et les flavonoïdes (Rawani et al., 2011 ; Agha et al., 2013).

L'Algérie est un pays méditerranéen avec une diversité significative de la flore qui contient jusqu'à 3000 espèces et 1000 genres (Bouabdelli et al., 2012). De cette raison, dans cette optique que s'inscrit l'objectif du présent travail qui consiste à évaluer l'effet protecteur des extraits de deux plantes endémiques du Sahara occidental vis-à-vis d'une toxicité induite par le PCP. Ce sont *Perralderia coronopifolia* cosse. de la famille Asteraceae, et *Gailloniaia reboudiana* de la famille Rubiaceae.

Dans ce cadre, trois études ont été réalisées parallèlement:

La première partie présente une étude expérimentale *in vitro* et *in vivo* vise à évaluer différentes propriétés de l'extrait d'éthyle d'acétate et l'extrait *n*-butanol de la plante *Perralderia coronopifolia*.

La deuxième partie est une étude expérimentale *in vitro* et *in vivo* vise à évaluer l'extrait méthanolique de la plante *Gailloniaia reboudiana*.

Dans ces deux parties, l'étude *in vitro* se concentre sur :

- ✓ Une évaluation des polyphénols et de flavonoïdes des trois extraits.
- ✓ Une évaluation de leurs activités antioxydante totale, leur activité anti-radicalaire de DPPH', de radicaux hydroxyles et de peroxyde d'hydrogène.
- ✓ Une évaluation de la puissance de réduction, de chélation de métaux, d'inhibition de la peroxydation lipidique.
- ✓ Une évaluation de la capacité des extraits à protéger les dommages d'ADN causés par la photolyse UV de H₂O₂.
- ✓ Une évaluation de la capacité antiproliférative des extraits en utilisant des lignées cellulaires cancéreuses par l'utilisation de l'instrument xCELLigence RTCA et le test ELISA-BrdU de prolifération de cellules.
- ✓ Une évaluation de l'effet cytotoxique des extraits par le test de lactate déshydrogénase (LDH).

L'étude *in vivo* se concentre à évaluer l'effet protecteur de l'extrait *n*-butanol de *Perralderia coronopifolia* et l'extrait métanolique de *Gaillonaia reboudiana* vis-à-vis d'une toxicité provoquée par le PCP. Nous nous sommes intéressés à faire :

- ✓ Une évaluation du pouvoir antioxydant des extraits sur la peroxydation lipidique, les réserves de glutathion et l'activité de la glutathion peroxydase.
- ✓ Une évaluation de pouvoir protecteur des extraits à moduler la toxicité induite par le PCP et l'altération oxydative chez des ratte femelles.
- ✓ Une évaluation de l'effet de différents traitements sur les paramètres biochimiques.

La troisième partie est une étude histologique qui vise à évaluer l'effet protecteur de de l'extrait *n*-butanol de *Perralderia coronopifolia* et l'extrait métanolique de *Gaillonaia reboudiana* vis-à-vis des altérations structurelles de quelques organes chez les rats recevant le PCP. Cette étude focalise sur :

- ✓ Une observation microscopique de l'effet du PCP et des différents extraits sur la structure de quelques organes (foie, reins et cœur) à l'aide de la microscopie optique, en utilisant des coupes histologiques.

I. Les pesticides

Les pesticides sont des composés chimiques organique ou inorganique, naturel ou synthétique, dotés de propriétés toxicologiques, utilisés en milieu agricole et également pour l'entretien des voiries ou par les jardiniers amateurs pour combattre les macro/microorganismes vivants indésirables. Ce sont utilisés dans la composition de quelques produits vétérinaires, des produits de la protection des bois et d'autres matériaux (vernis, peinture, etc.), des produits désinfectants ménagers utilisées en dehors de l'agriculture pour l'hygiène générale (en milieu hospitalier, piscine, voies routières, aérodromes, voies ferrées, etc) (Rifai, 2013).

Les pesticides, appelés également produits phytopharmaceutiques, agro-pharmaceutiques ou produits de protection, sont des poisons destinés à tuer ou repousser les adventices, les animaux ou les plantes jugés nuisibles aux plantations (Amara, 2012).

Les pesticides sont répertoriés généralement en utilisant trois modes de classification par :

- Origine : les pesticides sont soit organiques contiennent des carbones ou inorganiques dérivés essentiellement de minéraux.
- Famille chimique : les pesticides sont classés selon la nature chimique de la substance active majoritaire et répartis en organophosphorés, organochlorés, carbamates, thiocarbamates, pyréthroïdes et autre (El Mrabet, 2008).
- Cible: classification consiste à répartir les pesticides en fonction du type de parasite à contrôler ou à éliminer. On définit ainsi les herbicides, insecticides, rodenticides, acaricides, etc. Le tableau (01) ci-dessous illustre quelques pesticides classifiés selon leurs cibles.

Tableau 01: Classification des pesticides selon leur cible (Jawich, 2005 ; Rifai, 2013).

Pesticide	Cibles visées	Exemples de cibles
Acaricide	Acariens	Phytopte de l'érable
Avicide	Oiseaux	Pigeon
Fongicide	Champignons microscopiques causant des maladies des plantes	<i>Diplocarpon rosae</i> causant la tache noire du rosier <i>Pucciniastrum epilobii</i> causant la rouille des aiguilles du sapin <i>Venturia inaequalis</i> causant la tavelure du pommier
Herbicide	Végétaux herbacés	Chénopode ; Chiendent Herbe à la puce ; Plantain
Insecticide	Insectes	Blatte, Doryphore de la pomme de terre Punaise velue, Tordeuse des bourgeons de l'épinette
Molluscicide	Mollusques terrestres	Escargot Limace
Nématocide	Nématodes causant des maladies des plantes	<i>Meloidogyne hapla</i> causant la nodosité des racines chez la carotte
Phytocide	Espèces végétales herbacées et ligneuses	Arbre à grand déploiement
Piscicide	Poissons	Meunier noir
Rodenticide	Rongeurs	Rat, Souris

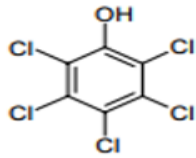
Parmi ces pesticides on trouve les organochlorés qui sont des composés organiques, soutirés par la chloration de distincts hydrocarbures insaturés. Les pesticides organochlorés sont des faibles hydrosolubles, mais leur solubilité dans les solvants organiques est élevée. Ils sont très résistants à la dégradation biologique, chimique et photolytique (Juc, 2007). Parmi les pesticides organochlorés les plus connus, on distingue Le pentachlorophénol (PCP).

II. Le pentachlorophénol

Le pentachlorophénol (PCP) est une substance synthétique, fabriquée à partir d'autres produits chimiques, et ne se produit pas naturellement dans l'environnement. C'est un composé aromatique organique. Le PCP pur existe en tant que cristaux incolores, a une odeur phénolique caractéristique

très forte quand chaud mais très peu d'odeur à la température ambiante (Gao et al., 2008). Les propriétés physico-chimiques du PCP sont résumées dans le tableau (02) ci-dessous.

Tableau 02: Propriétés physico-chimiques du pentachlorophénol (ATSDR, 2001).

Formule chimique	C ₆ Cl ₅ OH	Point de fusion	191 °C
Structure chimique		Point d'ébullition	310°C (décomposition)
Masse molaire (g/mol)	266.34	Densité gaz / vapeur	9
Masse volumique (g/cm³)	1.98	Etat physique	Solide (granulés ou poudre)
Pression de vapeur (mmHg)	1.7 x 10 ⁻⁴	Solubilité	20-25 (25°C)
Coefficient de partage (water octanol)	Log k _{ow} = 4.5	VLEP indicative (mg/m³)	0.5
Constante de Henry (atm-m³/mol)	3.4 x 10 ⁻⁶	Numéro CAS	87-86-5

VLEP : valeurs limites d'exposition professionnelle ; CAS = Chemical Abstracts Services.

II.1 Devenir du PCP

Le PCP est rejeté dans l'air par évaporation. Il pénètre dans les eaux de surface et coule au fond des nappes d'eau souterraine et également dans le sol à la suite de déversements, d'élimination à des sites de déchets dangereux, ou par son utilisation comme un pesticide (EPA, 2012 ; Montano et al., 2013). En outre, un certain nombre d'autres produits chimiques, notamment l'hexachlorobenzène, le pentachlorobenzène et les isomères d'hexachlorure de benzène, sont métabolisés en pentachlorophénol.

Les propriétés physiques et chimiques du composé suggèrent que peu de molécules s'évaporeront dans l'atmosphère et que la plupart d'entre elles se déplaceront avec l'eau et généralement se colleront aux particules de sol. Le mouvement du PCP dans les sols et sa vitesse d'infiltration dépendent de ces propriétés physico-chimiques (solubilité dans l'eau, ionisation,

volatilité, persistance dans le milieu, etc), mais également du type de sol (humidité, taux de matière organique, acidité). Le composé peut être présent chez les poissons ou d'autres espèces utilisées pour l'alimentation (Besser et al., 2016 ; Du et al., 2017).

L'homme peut être exposé à des niveaux très bas de PCP par l'air intérieur et extérieur, la nourriture, le sol et l'eau potable (Zheng et al., 2011). L'exposition peut aussi résulter d'un contact cutané avec du bois traité avec des préservatifs contenant du PCP. Les niveaux de risque de contamination en milieu de travail, près de certains sites de déchets dangereux et près des sites de déversements accidentels sont généralement plus élevés que dans l'environnement général (Montano et al., 2013).

Aussi bien l'exposition au PCP en mangeant des aliments contaminés est limitée. On estime que l'apport moyen en aliments est de 0,0105 mg de PCP pour un homme de 70 kg. L'apport quotidien en buvant de l'eau contaminée est également faible et est estimé à environ 0,021 mg pour un homme de 70 kg. Les personnes qui travaillent ou vivent près de sources de PCP sont exposées à des niveaux plus élevés (ATSDR, 2001).

Le PCP est sensible à la lumière et peut avoir partiellement une photo-dégradation, et surtout lorsqu'il se retrouve sous sa forme libre dissociée soit dans l'eau lorsque le pH est élevé (demi-vie rapportée de 0,86 heure) ou sa forme Photo-oxydé dans l'atmosphère principalement basé sur les réactions avec les OH[·] radicaux (demi-vie rapportée de 19,43 jours) (EPA, 2012 ; Bacon, 2014). Les produits résultants de la photo-dégradation sont :

- ✓ Les tetrachlorophenols (C₆CL₃OH) et les trichlorophenols (C₆CL₂OH).
- ✓ Les dihydroxybenzens chlorés comme le tetrachlororesorcinol (C₆H₂Cl₄O₂) et le tétrachlorocatéchol (C₆H₂Cl₄O₂).
- ✓ Les fragments non aromatiques comme l'acide dichloromaleic (C₄C₁₂O₃), le dioxyde de carbone (CO₂) et quelques ions chlorure.

Le PCP est un composé peu biodégradable chez l'homme. La transformation primaire ainsi que la minéralisation ont été effectuées dans des conditions naturelles principalement par les microorganismes existants dans le sol traité. Cette dégradation est relativement lente. Les principales voies métaboliques sont:

- ✓ La méthylation pour donner la méthyl éther du PCP (pentachloroanisole).
- ✓ L'acétylation du groupe hydroxyle (PCP-acétate).

- ✓ La déchloration entetrachlorophenols.
- ✓ L'hydroxylation à tetrachlorodihydroxybenzens.
- ✓ la conjugaison pour produire le glucuronide.

Ces métabolites sont encore transformés et un certain nombre d'intermédiaires peuvent survenir (Constanze et al., 2014). L'étape limitant est la fission cyclique des substances aliphatiques chlorées qui sont encore déchlorées et métabolisées.

Les produits résultants de la dégradation du PCP sont illustrés dans la figure (01) ci-dessous :

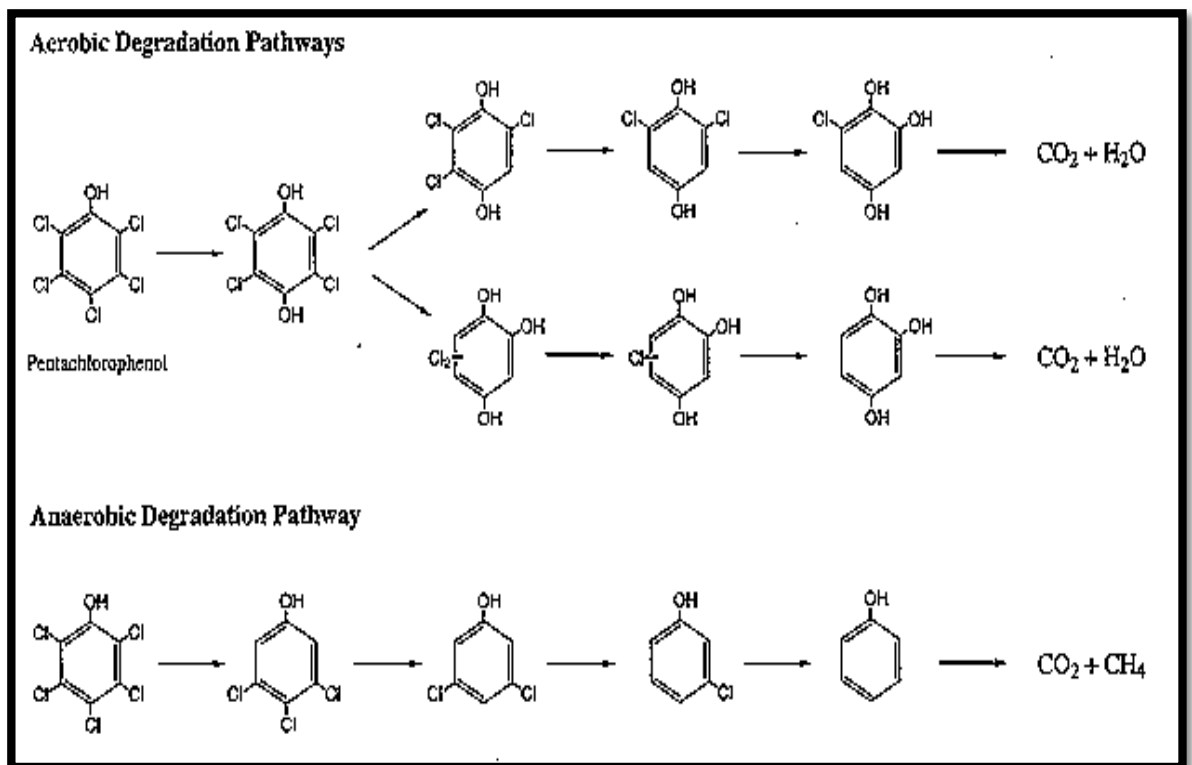


Figure 01: Dégradation aérobie et anaérobie du pentachlorophénol (Yu and Shepherd, 1997).

II.2 Toxicocinétique

Le PCP est absorbé par voie orale, cutanée et par inhalation (Karlsson et al., 2013). Chez l'homme, La demi-vie moyenne de l'absorption a été calculée à environ 1,3 heure, ce qui indique que l'absorption orale de PCP chez l'homme est rapide (Braun et al., 1979). Chez les rats et les singes, l'absorption orale de PCP par le tractus gastro-intestinal était rapide et surtout chez les femelles que les mâles, par des constantes de vitesse (le délai d'action d'un principe actif) d'absorption de $1,95 \text{ heure}^{-1}$ et $1,52 \text{ heure}^{-1}$ pour les rats mâles et femelles, respectivement, et $0,215$

heures⁻¹ et 0,383 heure⁻¹ pour les singes mâles et femelles, respectivement. Les demi-vies d'absorption ont été de 3,64 et 1,81 heures, pour les singes mâles et femelles, respectivement (ATSDR, 2001).

Les niveaux de distribution du PCP ont été mesurés dans l'urine et les tissus collectés à partir des éléments étudiés, le produit passe dans le sang où il se combine aux protéines plasmatiques. La liaison de PCP aux protéines plasmatiques joue un rôle important dans sa distribution, car les protéines réduisent l'attribution de PCP aux différents tissus organiques. Les taux élevés de PCP dans le foie et les reins indiquant peut-être une clé et des voies de métabolisme et d'élimination. Le rein est le principal site d'accumulation de PCP (Peng et al., 2016 ; Peng et al., 2017).

L'élimination du PCP de l'organisme se faisait par catabolisme en tétrachlorohydroquinone, par excrétion de PCP inchangée et de son conjugué glucuronide dans l'urine et par excrétion de PCP ou de ses métabolites dans la bile. Le PCP n'est pas largement métabolisé, comme en témoigne une grande partie de la dose administrée (par voie orale, cutanée ou par inhalation) excrétée dans l'urine est inchangée chez toutes les espèces étudiées (Wang et al., 2001). Une importante liaison protéique plasmatique du PCP peut expliquer le faible degré de métabolisme parce que le matériel lié aux protéines n'est pas facilement distribué aux tissus.

Cependant, les données humaines et animales disponibles indiquent que le métabolisme du PCP se produit dans le foie (Constanze et al., 2014 ; Peng et al., 2017), et les voies principales sont la conjugaison pour former le glucuronide et la déchloration oxydative pour composer le tétrachloro-p-hydroquinone (TCHQ) (Wang et al., 2001).

Le métabolisme du PCP peut également se faire par les quinols TCHQ et Cl₄CAT via les enzymes du cytochrome P₄₅₀ du micrososome et que ces quinols peuvent être oxydés par des intermédiaires de la semiquinone (tétrachloro-1,2-semiquinone [Cl₄-1,2-SQ] et tétrachloro-1,4-semiquinone [Cl₄-1,4-SQ]) dans les quinones correspondantes (tétrachloro-1,2-benzoquinone [Cl₄-1,2-BQ] et tétrachloro-1,4-benzoquinone [Cl₄-1,4-BQ]). Les quinones et les semiquinones sont toutes deux électrophiles et peuvent se lier à des macromolécules cellulaires (Zhu and Shan, 2009).

Un résumé des voies métaboliques possibles pour le PCP est présenté dans la figure (02) ci-dessous.

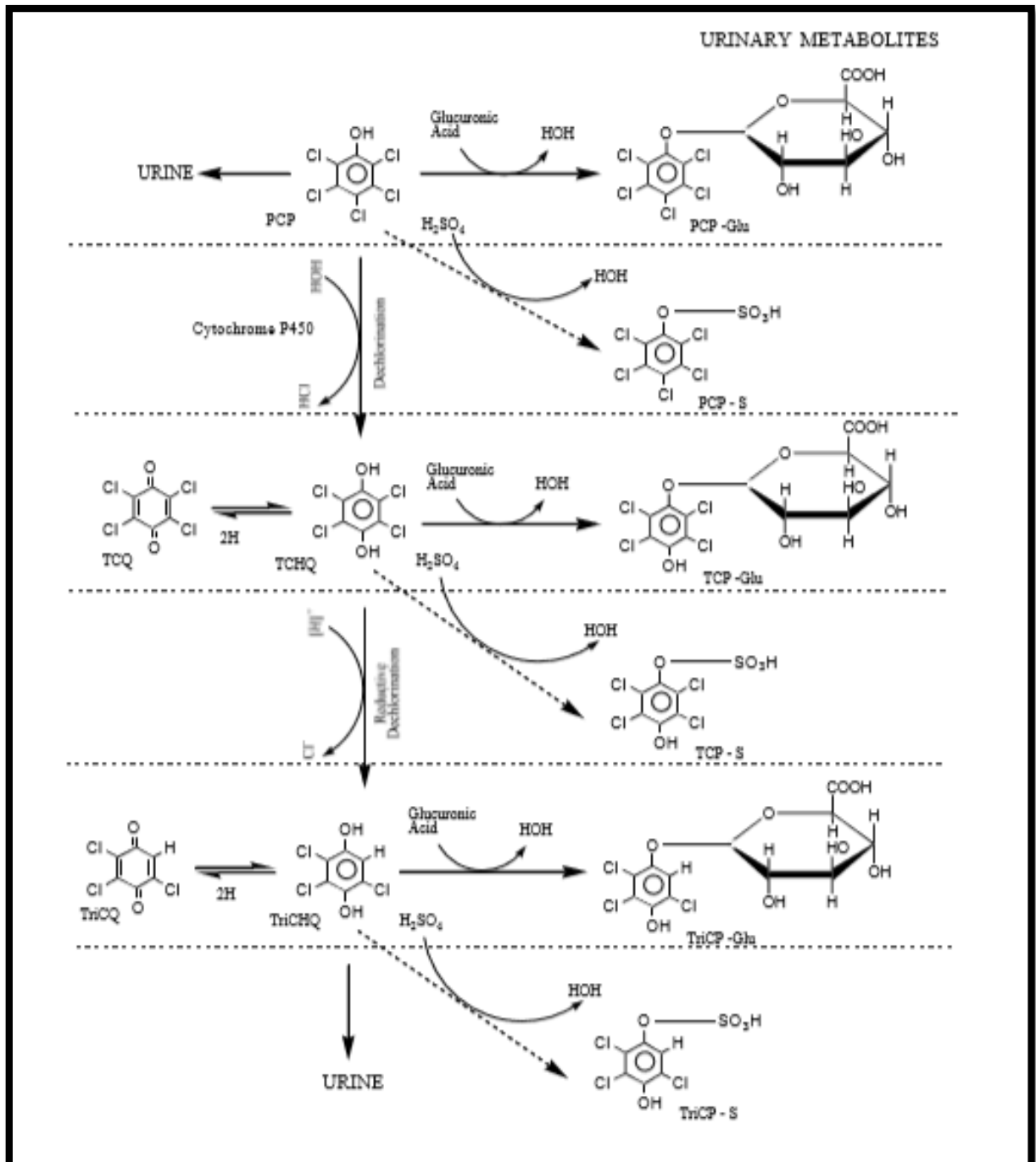


Figure 02 : voies métaboliques du pentachlorophénol (ATSDR, 2001).

PCP : pentachlorophénol; PCP-Glu : pentachlorophénol- β -glucuronide; PCP-S : pentachlorophénylsulfate; TCHQ : tetrachloro-p-hydroquinone; TCP-Glu : tetrachlorophénol- β -glucuronide; TCP-S : tetrachlorophénylsulfate; TCQ : tetrachloroquinone; TriCHQ = trichloro-p-hydroquinone; TriCP-Glu : trichlorophényl- β -glucuronide; TriCP-S : trichlorophénylsulfate; TriCQ : trichloro-p-quinone.

L'urine est la principale voie d'élimination du pentachlorophénol chez toutes les espèces étudiées, y compris l'homme. Chez l'homme, l'élimination dans les urines et les selles se fait principalement sous forme de PCP libre (75 % à 80 %) ou sous forme glucuro-conjuguée (10 à 15 %), le reste du produit étant métabolisé (oxydation et déchloration) (Braun et al., 1979). Chez les rats, l'élimination d'environ 74% d'une dose unique de 40 mg/kg de PCP est sous forme inchangée et 12% sous forme de glucuronide de PCP en 72 heures. Le principal métabolite est la tétrahydroquinone, qui peut être également éliminée rapidement dans l'urine sous forme libre, mais surtout sous forme glucuro-conjuguée. L'absorption et l'élimination sont rapides (Wang et al., 2001).

Chez les rats, des demi-vies de 17 et 13 heures ont été enregistrées pour des mâles et femelles recevant 10 mg / kg du PCP. Alors que chez l'homme, pour une dose de 0,1 mg/kg per os, le pic plasmatique est atteint en 4 heures environ, la demi-vie du produit est voisine de 30 heures ; la recirculation entéro-hépatique a été considérée comme importante ; 90 % du produit sont excrétés en 8 jours (INRS, 2013). Une demi-vie moyenne de 16 jours a été retrouvée chez les travailleurs exposés professionnellement au PCP avec aucune accumulation de celui-là n'a pu être observée dans la circulation entéro-hépatique (Pekari et al., 1991).

II.3 Types de toxicité

Le PCP est peu soluble dans l'eau. Il s'accumule dans les tissus des organismes où il est bioamplifié au fil de la chaîne alimentaire (Jadwiga et al., 2016 ; Xu et al., 2016). L'exposition au PCP peut entraîner une détérioration des fonctions respiratoires, hépatiques et rénales et du système nerveux central et reproducteur (Morgan et al., 2015).

Le PCP est utilisé pour la préservation et la protection du bois est jusqu'à dix fois plus toxique que le PCP pur, puisque de nombreuses impuretés hautement réactives et toxiques le composent, telles que le tétrachlorophénol, les trichlorophénols, l'hexachlorobenzène, les polychlorodibenzoparadioxines, les polychlorodibenzofuranes et les phénoxyphénols chlorés. Ce contaminant est classifié comme « possiblement cancérigène pour les humains ».

Les effets aigus (ou à court terme) se traduisent généralement avec apparition immédiate de symptômes peu de temps après le traitement. Les intoxications aiguës surviennent lorsque le sujet est exposé à des quantités importantes du PCP (INRS, 2013).

Quelle que soit l'espèce et la voie d'administration, le PCP induit des signes généraux comme une fatigue, fièvre, rougeurs, rougeur oculaire, troubles visuels, nausées, vomissement, etc.) et des

effets sévères neurologiques (convulsion et faiblesse neuromusculaire progressive), métaboliques (hyperthermie), cardiaque (élévation des fréquences cardiaque, défaillance cardiaque dans les intoxications mortelles), respiratoire (toux et douleurs thoraciques), digestifs (diarrhées, douleurs abdominales) (Mieczyslaw, 2008).

Chez les animaux qui meurent, la rigidité cadavérique est rapide et intense. L'autopsie révèle une atteinte étendue du système vasculaire, avec congestion et œdème des tissus parenchymateux et avec des lésions des petits vaisseaux (ATSDR, 2001).

Les effets chroniques se développent avec apparition d'une pathologie après des expositions répétées dans le temps, pour des doses de PCP le plus souvent faibles, qui sont susceptibles de s'accumuler dans l'organisme ou d'entraîner des phénomènes irritatifs au niveau de différents organes. La toxicité chronique peut être aussi le résultat d'intoxications aiguës répétées.

Les études subaiguës et chroniques réalisées chez les rats montrent que les effets toxiques s'exercent essentiellement au niveau du foie selon la dose et la durée du traitement, des changements morphologiques des cellules hépatiques, des augmentations du poids du foie et de certaines activités enzymatiques microsomales et des excréctions très accrues de porphyrine et d'acide δ -aminolévulinique. Chez les bovins, traités à la dose de 15 mg/kg/j per os pendant 42 jours, des lésions hépatiques existent également, mais elles sont plus discrètes que chez le rat. Dans de nombreuses études, l'hépatotoxicité du produit technique se révèle très supérieure à celle du produit pur ; elle est donc due, aux impuretés présentes (ATSDR, 2001).

Plusieurs recherches scientifiques ont montré que le stress oxydatif est la cause principale de certaines pathologies comme : les tumeurs, les insuffisances rénales, les maladies hépatiques, les atteintes osseuses...etc.

III. Pentachlorophénole et stress oxydatif

La notion de stress oxydant est l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactive de l'oxygène (ERO), suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue des ERO, soit à une diminution de la capacité de défenses antioxydantes.

Parmi les ERO formés chez les êtres vivants, on distingue l'anion superoxyde (O_2^-), le monoxyde d'azote NO, les radicaux peroxydes (ROO^\cdot) et hydroxydes (OH^\cdot). Il existe d'autres ERO, comme l'oxygène singlet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le peroxydinitrite (ONOO), ne

sont pas des radicaux libres, mais sont réactifs et peuvent être des précurseurs de radicaux (Paul et al., 2012).

De plus, le système prooxydant comprend des ERO et aussi de l'azote (NRO), soit de source endogène : La respiration oxydative (90% des EROs cellulaires sont produits par la mitochondrie), l'auto-oxydation de certaines molécules (la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones) et les réactions inflammatoires (par la NADPH oxydase lors la phagocytose). Ou, soit de source exogène tels que certaines substances toxiques comme l'oxyde et le dioxyde d'azote (NO et NO₂) ou les métaux lourds présents dans l'environnement (tabac, pollution industriel, goudron) (Flora et al., 2008).

De nombreux mécanismes participent à cet déséquilibre soit en favorisant la production de ERO tels que l'hyperglycémie, des concentrations élevées de lipides tissulaires (adiposité ectopique), l'inflammation chronique, l'infiltration et l'activation excessive des leucocytes, la production excessive d'hormones du système rénine-angiotensine, et l'hyperleptinémie (Vincent et al., 2007), ou soit par l'insuffisance de défenses antioxydantes tels que un apport alimentaire faible en antioxydants naturels, en vitamines (C, E, caroténoïdes) et en minéraux (zinc, sélénium, magnésium). De plus, l'association de ces mécanismes va contribuer au modification des cascades de signalisation, à l'activation des autres processus comme l'inflammation et au stress oxydant systémique (Lavoie, 2012 ; Weigand-Heller et al., 2012).

Les antioxydants sont des molécules qui peuvent ralentir ou empêcher l'oxydation d'autres substances chimiques à leurs contacts. L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables d'arrêter ces réactions en chaîne en se réduisant les radicaux et annihilant ainsi leur action (Maja et al., 2015). Les principaux mécanismes de défense antioxydants comprennent les systèmes enzymatiques et non enzymatiques.

III.1 Mécanismes de la toxicité du PCP

Le PCP est capable de perturber de manière significative la structure bicouche phospholipidique de la membrane plasmique. Le mécanisme d'action toxique du PCP a pu être démontré : il met en jeu le découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale (processus permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP grâce à l'énergie libérée par l'oxydation) (INRS, 2013).

L'identification du mécanisme de ce découplage a été élucidée lorsque la protéine responsable du phénomène a été isolée : l'UCP (UnCoupling Protein). La toxicité du PCP a été attribuée à la perturbation membranaire de la cellule et à la dissipation de la force motrice protonique (PMF) (Mukhopadhyay et al., 2004 ; Sophie et al., 2004).

Lorsqu'une nouvelle voie est introduite dans un réseau métabolique, de nouveaux métabolites peuvent être toxiques, soit intrinsèquement, soit parce qu'ils interfèrent avec les fonctions des protéines qui n'ont pas évolué pour exclure les métabolites invisibles des sites sensibles (Kim et Copley, 2012). Le TCHQ semble être une forme plus toxique du xénobiotique capable d'induire la rupture du brin d'ADN, adduits protéiques et épuisement de la teneur en glutathion dans le tissu hépatique.

Le début des propriétés toxiques était associé à la lésion du système électrique membranaire lorsqu'une quantité importante de PCP se lie à la membrane. Cela conduit à la production d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène à un taux très élevé, provoquant un stress oxydatif cellulaire et tissulaire et des différentes altérations (Kan et al., 2015) :

III.1.1 Au niveau microsomale

Il a été démontré que les pesticides organochlorés sont des inducteurs de CYP2B et -3A ARNm hépatiques et des protéines correspondantes. Ainsi, ils peuvent induire le cytochrome impliqué dans leur propre métabolisme ainsi que le métabolisme d'autres composés qui sont des substrats pour les mêmes enzymes du cytochrome (Khaled et al., 2012).

De plus, plusieurs pesticides induisent l'expression du CYP, en agissant sur l'induction du Prégnane X, récepteur nucléaire sensible aux xénobiotiques (PXR) et le récepteur constitutif de l'androstane (CAR), ce sont les principaux régulateurs de l'expression des gènes du CYP. Il a été suggéré que de nombreux pesticides sont des agonistes du PXR (Pelkonen et al., 2008 ; Khaled et al., 2012 ; Fang et al., 2015).

Le PCP peut induire l'activité de cytochromes P₄₅₀ dans les tissus chez l'homme et les animaux (Peng et al., 2016 ; Peng et al., 2017). Il aurait été transformé en TCHQ par un cytochrome P₄₅₀ (CYP 3A4) humain. L'induction des enzymes cytochromes modifie l'équilibre entre la détoxification et l'activation, ce qui peut dans certains cas conduire à une toxicité accrue (Khaled et al., 2012).

III.1.2 Au niveau mitochondriale

a- Perturbation du flux d'électrons et surproduction des ERO

La chaîne respiratoire oxyde les substrats et en suite le transfert d'électrons induit un pompage des protons vers l'extérieur de la mitochondrie. Cela crée un gradient électrochimique de protons, qui s'oppose au pompage et en conséquence à l'oxydation (Sophie et al., 2004). Le gradient électrochimique qui en résulte fournit l'énergie nécessaire pour actionner un rotor moléculaire qui permet à l'ATP synthase de produire de l'ATP.

Le PCP exerce un effet toxique en découplant la phosphorylation oxydative par une perméabilité des membranes aux protons. Il peut aussi se décomposer et provoquer des altérations de la structure et de la fonction membranaire. Quand le gradient électrochimique de protons devient dominant, les électrons sont bloqués dans la chaîne respiratoire et certains peuvent réagir avec l'oxygène moléculaire (figure 03). Cela conduit à la production d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène à un taux beaucoup plus élevé qui augmente les dommages oxydatifs (Zhou et al., 2013).

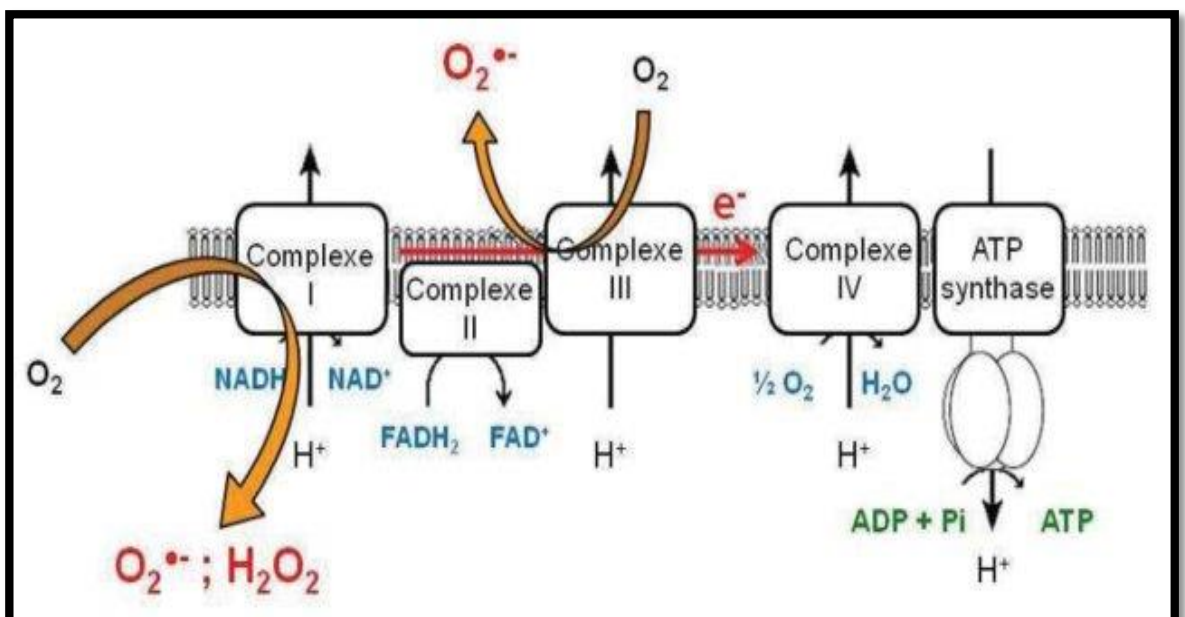


Figure 03 : Production des EROs au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Degletagne, 2011).

b- Changements de la configuration enzymatique

Ceci pourrait bien également induire des changements dans les enzymes impliquées dans la phosphorylation oxydative (Zhou et al., 2013). Car l'ion superoxyde va interagir avec l'UCP en

augmentant le transport de protons par cette protéine vers la matrice (Daniel et al., 2002). Donc, cette interaction UCP- O_2^* (figure 04) est un facteur important dans le phénomène de découplage en diminuant le gradient électrochimique, et facilitant alors le transfert d'électrons et l'oxydation des coenzymes. Une telle interaction peut induire des changements de configuration dans les enzymes associées à la phosphorylation oxydative, ou empêcher la liaison ou la refixations de facteurs structuraux ou fonctionnels essentiels à ce processus bioénergétique (Raha, 2000).

La perturbation du flux d'électrons au sein du complexe I de la chaîne respiratoire explique la surproduction des ERO et pareillement le changement des états d'oxydoréduction du couple NADH/NAD⁺, en entraînant un déséquilibre redox pouvant stimuler la mort cellulaire.

c- Perte d'énergie cellulaire

Ce phénomène conduit à une perte d'énergie pour la cellule puisque l'énergie des oxydations n'est pas utilisée pour synthétiser l'ATP, elle est totalement dissipée sous forme de chaleur (figure 04). Donc il n'y a plus de couplage entre respiration et synthèse d'ATP. Si une production d'ATP a lieu, elle se produit avec un potentiel électrochimique plus bas (de l'ordre de 130-150 milliVolts) (Daniel et al., 2002). L'élimination urinaire du produit explique que les lésions rénales renforcent sa toxicité. On croit généralement que le PCP provoque un métabolisme aérobie accéléré et augmente la production de chaleur et cause la perte de la résistance électrique de la membrane (INRS, 2013).

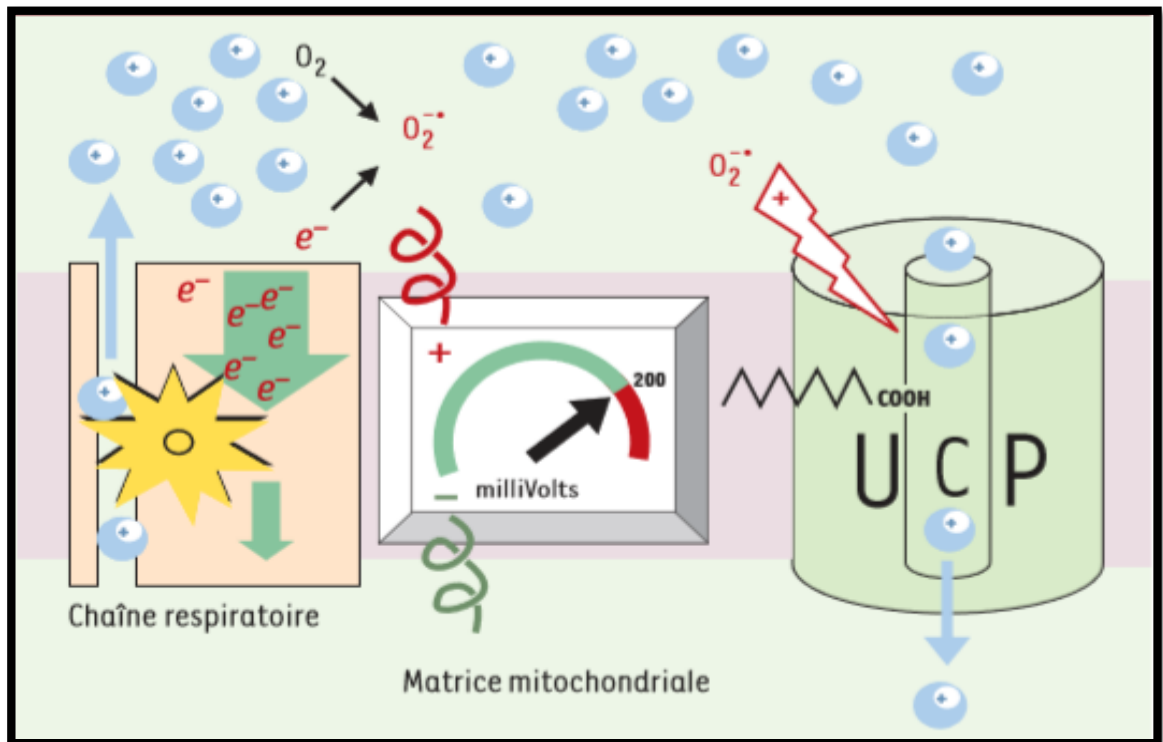


Figure 04 : Activation du transport par l'ion superoxyde via les UCP (UnCoupling Proteins) (Daniel et al., 2002).

III.1.3 Au niveau de l'ADN, de peptides et de protéines

a- Dommages de l'ADN

L'ADN peut être ciblé par certains constituants de source endogène et/ou exogène, y compris les ERO, soit en lui induisant des changements covalents (des lésions aux bases nucléotidiques : purines et pyrimidines), des cassures simples brin ou doubles brin de la chaîne oligo-nucléotidique, ou des liaisons avec des résidus protéiques (figure 05). Ces modifications ont beaucoup de gravités sur la réplication du génome et par conséquent l'induction de nombreux type de tumeurs (Trachootham et al., 2009).

Le PCP favorise la dérégulation de plusieurs gènes liés au stress oxydatif et à la surexpression de molécules impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. Il favorise l'accumulation d'MDA et de 8-OHdG (8-oxodeoxyguanosine), qui sont considérées comme des biomarqueurs de lésions oxydatives induites par des radicaux libres. Les deux molécules, en tant peuvent refléter le degré de dommage oxydatif de l'ADN et sont positivement corrélées au degré de stress oxydatif *in vivo* (He et al., 2016). Chez les rats, l'exposition chronique au PCP augmentait le taux d'MDA,

d'OHdG et les adduits directs dans l'ADN hépatique, mais ne suffisait pas pour induire l'hépatocarcinogénèse (Sai-kato et al., 1995).

b- Dommages lipidiques

Les pesticides organochlorés affectent principalement le métabolisme des lipides dans les tissus adipeux et modifie la voie du glucose dans d'autres cellules (Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2010). Les acides gras polyinsaturés sont fréquemment ciblés par ERO, grâce à leurs hydrogènes bis-allyliques oxydables. La peroxydation lipidique est la dégradation du contenu lipidique membranaire ainsi que des lipoprotéines, qui peut induire des altérations fonctionnelles. Cette dernière peut être en modifiant leur perméabilité et leur fluidité ainsi qu'en agissant sur l'activité d'enzymes et des récepteurs. Ce processus se déroule en trois phases suivantes :

✓ L'initiation : le radical libre arrache un hydrogène d'un groupement méthylène (-CH₂). en existence d'O₂, le radical carboné est transformé en radical pyroxyde RO₂'.

✓ La propagation : le radical RO₂' arrache un hydrogène d'un autre acide gras polyinsaturé voisin qui à son tour créera un radical R', puis un radical RO₂', une réaction en chaîne s'établit.

✓ La terminaison : en existence des métaux de transition, les hydroperoxydes résultants précédemment peuvent se rencontrer et subir un clivage au niveau des liaisons C-C et produire des nouveaux stable (produits de décompositions) dont les plus toxiques sont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (Lehucher, 2001).

c- Dommages protéiques

Environ 99% du PCP présent dans le plasma était lié aux protéines, ce qui était probablement à l'origine d'un faible ratio tissus / plasma et d'un faible taux de clairance rénale. Les protéines peuvent identiquement être ciblées et modifiées structurellement par fragmentation ou dénaturation au cours des réactions radicalaires ou oxydatives sous l'agissement des ERO et ERN. Certaines réactions d'oxydation sont influencées par les cations métalliques (le cuivre et le fer) (Servais, 2004). Par exemple, l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés particulièrement de la cystéine et de la méthionine, se fait avec formation de ponts disulfures. Le PCP est capable d'induire un stress oxydatif, une apoptose et un arrêt du cycle cellulaire en conséquence de dommages à l'ADN (p53), de la réponse mitogène (cycline D1) et de l'apoptose (caspase 3) (Dorsey et al., 2006).

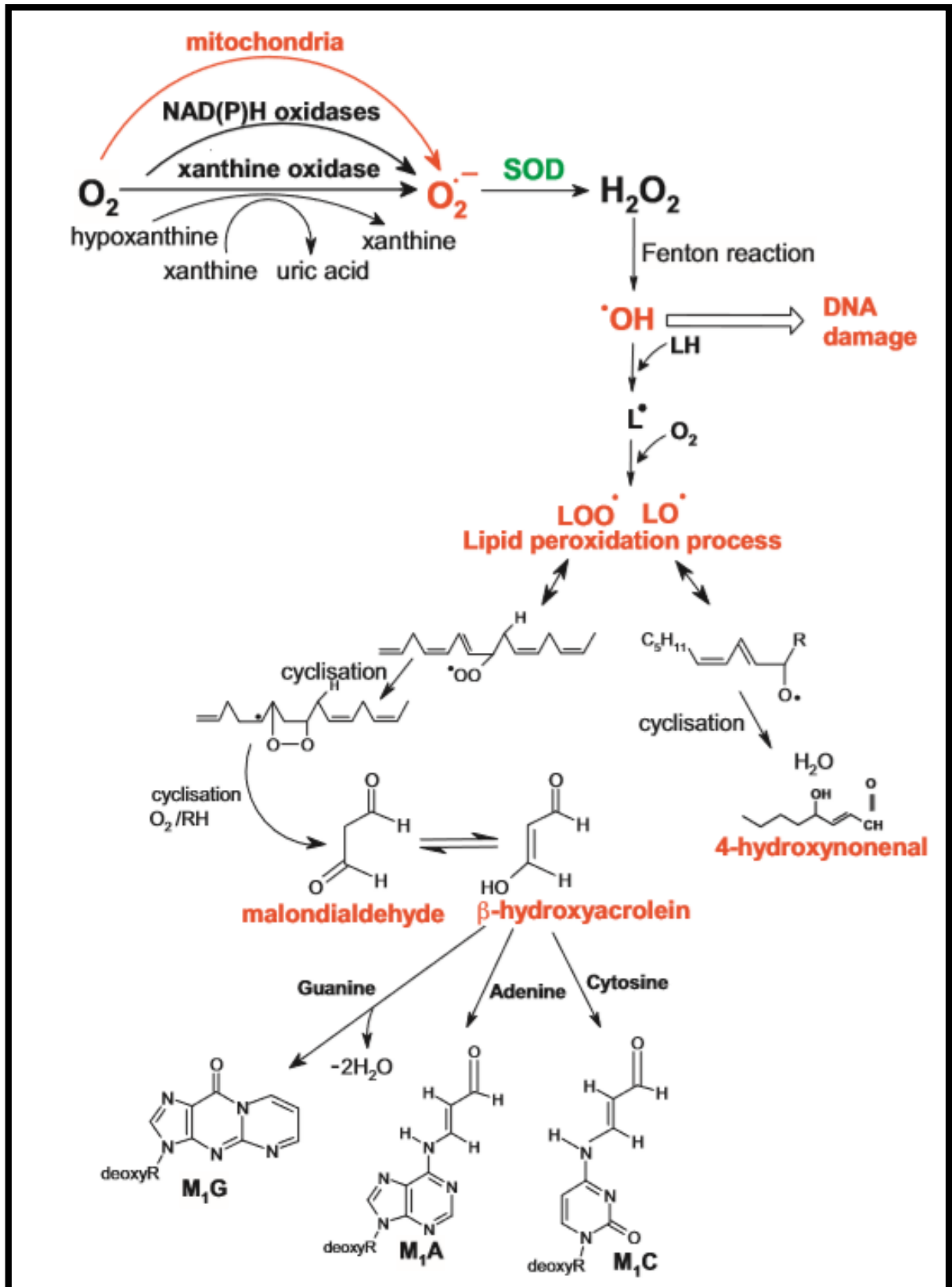


Figure 05 : Formation des EROs et induction des dommages aux composants cellulaires : l'ADN, les lipides et les protéines (Jomova et Valko, 2011).

En terme générale, la figure (06) illustre le mécanisme d'action des pesticides, qui pourraient pénétrer dans les cellules directement au travers de la membrane ou grâce à des mécanismes de transport. Ainsi, ils pourraient agir directement sur l'équilibre NADH/NAD^+ en augmentant les ERO qui perturberaient le fonctionnement mitochondrial. Mais ils pourraient également agir directement sur le complexe I de la chaîne respiratoire entraînant une augmentation des ERO, une induction des mécanismes apoptotiques par une libération du cytochromes C et une activation des caspases, une altération de l'ADN nucléaire, ainsi qu'une oxydation et une agrégation des protéines, telles que l' α -synucléine (protéine trouvée sur les terminaisons synaptiques, protège les cellules dopaminergiques contre la neurotoxicité (Steeve et al., 2013).

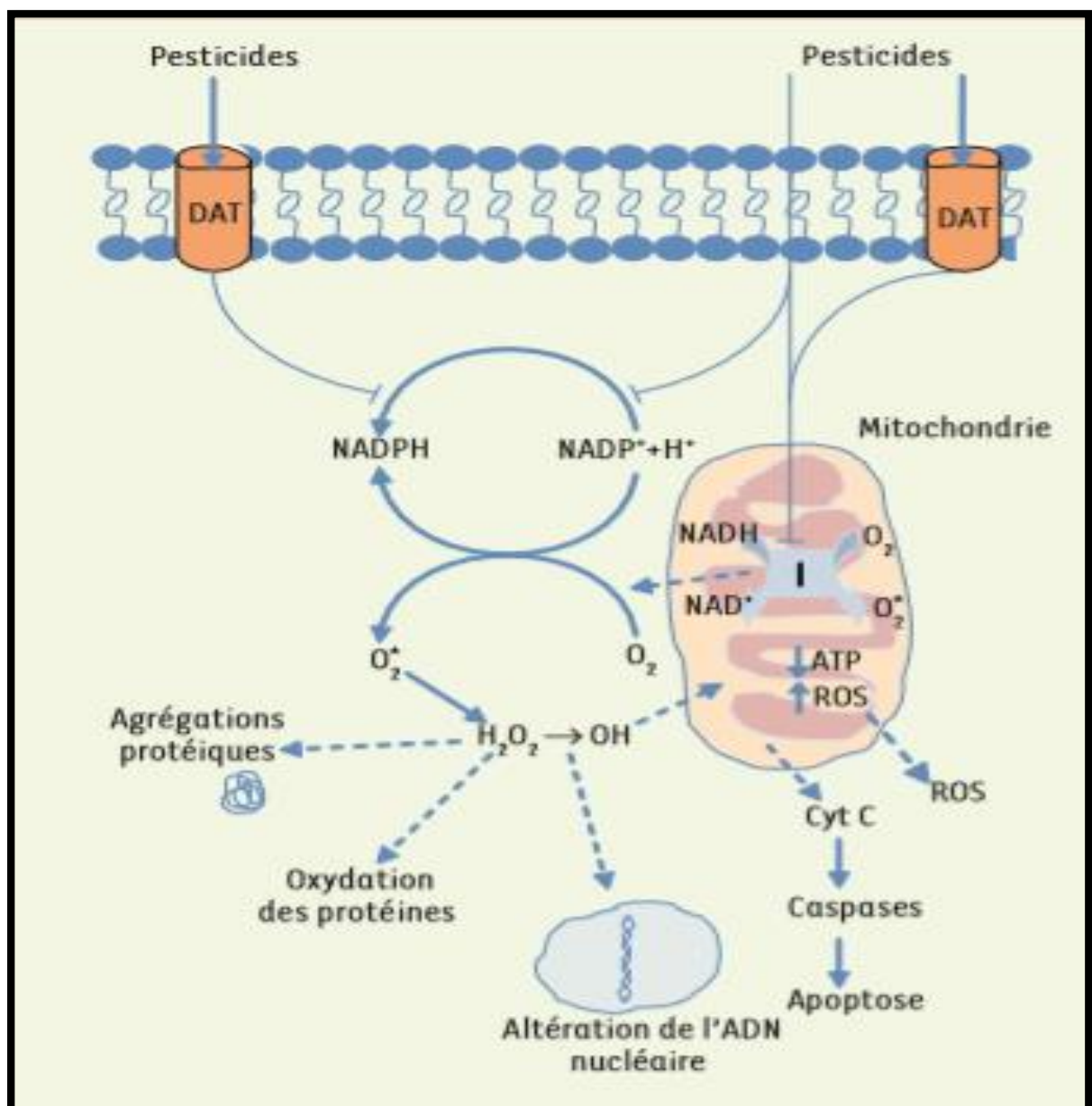


Figure 06 : Effets des pesticides sur la mitochondrie et conséquences au niveau cellulaire (Steeve et al., 2013).

III.2 Effets de PCP sur la santé

III.2.1 Effets génétique, mutagènes et cancérigènes

Certains effets peuvent également résulter de la dibenzo-p-dioxine chlorée et d'autres impuretés présentes dans le PCP de qualité technique. L'effet négatif du PCP pur sur l'homéostasie thyroïdienne et l'induction des dommages oxydatifs à l'ADN par exposition orale au PCP peuvent également contribuer à son spectre d'effets toxiques (ATSDR, 2001).

L'application de 50 μ M de PCP résulte en une formation de 17 adduits par 10⁹ nucléotides dans des cultures de cellules hépatiques de rat, 11 adduits par 10⁹ nucléotides dans des cultures de cellules de caille et 4,2 adduits par 10⁹ nucléotides dans des cultures de cellules hépatiques humaines. La formation d'adduits est accompagnée par une induction des CYP1A, CYP2B et CYP3B sous l'effet du PCP, ceci pour les cellules humaines et animales (Dubois et al., 1997). D'autres études relatives au PCP et ses métabolites quinoïdes remarquent un stress oxydatif en plus de la liaison directe avec l'ADN. Le PCP (test *in vivo*, 60 mg/Kg/jour pendant 27 semaines), le tétrachloro-1,4-benzoquinone (test *in vitro*, 5 mM) et le tétrachlorohydroquinone (test *in vitro*, 5 mM) entraînent la formation de différents types d'adduits et des cassures monobrin dans l'ADN (Lin et al., 2002).

Le PCP est faiblement mutagène chez les souris et peut être mutagène chez les levures. Des effets mutagènes faibles ont été observés dans des cultures de lymphocytes humains exposés au PCP. Les preuves suggèrent que le PCP est non mutagène ou faiblement mutagène (Mieczyslaw, 2008). Aucune preuve convaincante des effets cancérigènes du PCP chez l'homme n'est disponible (ATSDR, 2001). Les rapports actuels ne sont pas suffisants pour évaluer le potentiel du PCP à provoquer des effets cancérigènes chez les humains. La génération d'ERO, les dommages oxydatifs de l'ADN et les adduits directs à l'ADN ne sont pas suffisants pour l'induction de l'hépatocarcinogénèse par le PCP chez le rat (Lin et al., 2002).

L'Union européenne a classé le PCP en tant que R40: déclarations limitées d'un effet cancérigène (CE, 1993). Le Centre international de recherche sur le cancer (IARC pour : The International Agency for Cancer Research) considère que le PCP est peut-être cancérigène pour l'homme (groupe 2b). Cette conclusion était fondée sur le fait qu'il y avait des preuves-insuffisantes chez les humains, mais des preuves suffisantes sur la cancérigénicité du PCP chez les animaux de laboratoire (IARC, 1991).

III-2-2- Effets sur le système endocrinien et la reproduction

L'exposition au PCP peut causer des déformations morphologiques, éventuellement affecter la coordination du développement dans le système nerveux central et modifier les niveaux d'hormones thyroïdiennes en perturbant les voies de régulation des hormones thyroïdiennes avec effets hyperthyroïdiens possibles. L'exposition au PCP à 10 µg / L a entraîné une élévation des taux de 3, 3', 5-triiodothyronine (T3) et une diminution des taux de thyroxine (T4) (Yang et al., 2015). Le PCP produit des diminutions des concentrations circulantes et libres des hormones thyroïdiennes T3 et T4. Aussi bien le PCP induit une augmentation des concentrations moyennes d'insuline sérique. Aucune altération au niveau de cortisol n'a été démontrée (Rawlings et al., 1998).

Les expériences menées sur des rats indiquent que le PCP ne provoque pas d'effets sur la reproduction ni sur la fertilité, ni sur la réponse sexuelle (le taux d'ovulation, la taille du follicule et du corps jaune, la durée de la gestation) (Beard and Rawlings, 1999 ; Beard et al., 1999b). Aucune altération du nombre moyen de spermatozoïdes mobiles ou non, de numérations de spermatozoïdes épидидymaires ou testiculaires, ni de la morphologie des spermatozoïdes. En plus, aucune altération des hormones reproductives (taux d'estradiol, de testostérone, de progestérone, d'hormone stimulant le follicule et / ou d'hormone lutéinisante) et aucune altération histologique dans les tissus reproducteurs (ATSDR, 2001). Le PCP réduit la production cumulée d'œufs et le taux de fertilisation, augmente la malformation et inhibe la longueur corporelle des larves de poisson zèbre (Wen et al., 2019).

III.2.3 Effets hépatiques, rénaux et respiratoires

Le foie est un organe cible de la toxicité induite par le PCP. Une exposition orale aiguë, intermédiaire et chronique au PCP, a permis d'observer des signes d'effets biochimiques (altérations des activités des enzymes hépatiques), morphologiques (augmentation du poids du foie) et histopathologiques (hypertrophie, vacuolisation, hyperplasie, fibrose, nécrose et dégénérescence) (Agha et al., 2013).

À faibles doses, les effets sur le foie sont caractéristiques de l'induction enzymatique, des augmentations du poids du foie, une hypertrophie et une vacuolisation hépatocellulaires. La sévérité des dommages au foie augmente avec l'augmentation des concentrations d'exposition (Peng et al., 2016). Les modifications biochimiques ont consisté en une augmentation des taux sériques d'alanine et d'aspartate aminotransférase (Agha et al., 2013).

Il existe des preuves de toxicité rénale légère à modérée à la suite d'une exposition à long terme de PCP. Les effets toxiques les plus fréquemment rapportés sur les reins incluent une augmentation du poids, une modification des taux d'enzymes, une altération de la filtration glomérulaire et de la fonction tubulaire, une dégénérescence tubulaire rénale légère et des modifications vacuolaires grasses dans les tubules rénaux (Abhay et Sunanda, 2015).

La toxicité rénale par le PCP est liée aux dommages de la structure et à la fonction glomérulaire, qui peut être remarquable par des modifications biochimiques. Par exemple, une augmentation de la concentration d'azote dans le sang, Une diminution de l'activité de la phosphatase alcaline tubulaire proximale, une augmentation de la densité spécifique de l'urine et une incidence de la décoloration des reins liée à la dose (Villena et al., 1992). L'importance biologique de ces effets rénaux apparemment transitoires au regard de la toxicité à long terme n'est pas connue. Des effets histopathologiques sont rarement observés.

Le PCP augmente l'incidence de la métaplasie de la muqueuse nasale et de l'hyperplasie des cellules caliciformes chez les souris, provoque l'inflammation des voies respiratoires supérieures et bronchite (ATSDR, 2001).

III.2.4 Effets hématologiques, cardiovasculaires et neurologiques

Le PCP peut induire des effets hématologiques. Par exemple, une diminution du nombre de globules blancs, une diminution de l'hémoglobine et des érythrocytes, une anémie aplasique. Le PCP peut aussi provoquer une tachycardie, cet effet est peut-être le résultat de sa capacité de découpler la phosphorylation oxydative, conduisant à l'hyperthermie. Il affronte aussi la survenue de lésions vasculaires étendues et d'insuffisance cardiaque (Rugman and Cosstick 1990).

En plus le PCP provoque différents symptômes chez l'homme inclus : pyrexie, diaphorèse, hyperkinésie, contractions musculaires, tremblements, sensibilité épigastrique, douleur aux jambes, tachypnée et tachycardie en raison de la capacité du PCP à découpler la phosphorylation oxydative (résultant l'augmentation de la température corporelle) plutôt que d'un effet toxique direct du PCP sur les systèmes nerveux central ou périphérique. Il peut induire un délire, des convulsions intermittents et une irritabilité.

La surproduction d'ERO induite par le PCP contribue, elle aussi, au caractère neurotoxique. Des cellules de neuroblastome de souris en culture ont montré une augmentation du détachement cellulaire avec l'exposition au PCP. Il a également été constaté que la PCP influait sur la maturation de la myéline, bien qu'il ne soit pas clair si cet effet est dû à l'action directe de la PCP sur la feuille

de myéline ou à une perturbation de l'apport alimentaire ou du métabolisme des lipides. Le PCP est un composé neurotoxique qui provoque la mort cellulaire dans les neurones granulaires cérébelleux (Jaume et al., 2009).

III.3 Méthodes d'évaluation du stress oxydant

Les ERO sont malaisément mesurables grâce à leur brève durée de vie et leur haute réactivité. Actuellement, il existe des procédés et des méthodes directes supposées à évaluer le stress oxydant mais elles sont difficiles et onéreuses. Afin d'estimer l'importance du stress oxydant, des techniques indirectes sont fréquemment utilisées en mesurant des bio-marqueurs ou des produits ultimes des processus causés par les ERO (Lavoie, 2012).

Ces bio-marqueurs impliquent les enzymes superoxyde dismutases (SOD), catalase (CAT), glutathion réductase (GSH), glutathion peroxydase (GPx), les concentrations de glutathion et des vitamines antioxydantes (vitamine A, E et C), la peroxydation des lipides (taux de MDA), et la concentration en nitrite et de protéines glycosylées de façon non enzymatique (Encarnacion et al., 2012 ; Jaszek et al., 2013 ; Obodai et al., 2014).

La mesure de la peroxydation des lipides et de l'oxydation des protéines sont les dénonciateurs les plus usuels du dommage oxydatif. Les ERO sont cytotoxiques et peuvent exprimer des dysfonctions enzymatiques, des atteintes aux membranes cellulaires et aux liaisons des récepteurs à ces membranes (Pastoriza et al., 2015).

IV. La phytothérapie

La phytothérapie est l'utilisation de plantes médicinales et d'herbes potentiellement bénéfiques dans les objectifs thérapeutiques, la prévention et le traitement de divers syndromes (Jeyaprakash et al., 2011). Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples misent à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces composés les métabolites secondaires qui sont surtout illustrés en thérapeutique. L'Organisation mondiale de la santé a rapporté qu'un pourcentage majoritaire de la population utilise les plantes comme principal source pour le traitement de nombreuses maladies.

De nombreux remèdes à base de plantes sont utilisés pour prévenir les troubles systémiques. La manufacture pharmaceutique récente se pose sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques. Vu que seulement une petite partie des 400 000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phyto-chimiques

et pharmacologiques, et que chaque espèce peut tenir jusqu'à plusieurs milliers des ingrédients différents.

Les plantes sont exceptionnellement compliquées du point de vue de leur composition chimique. Elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents dont certains exclusivement (ou parfois un seul) sont répondeurs aux effets thérapeutiques ou toxiques. Il est donc nécessaire d'éprouver les principes actifs des plantes médicinales afin d'étudier leur efficacité, leur mode d'action, et bien entendu leur effet secondaire sur la santé humaine.

L'Algérie dispose d'une grande diversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes. L'Algérie possède plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% sont des espèces endémiques (Bouabdelli et al., 2012). Sa situation géographique entre la mer Méditerranée et le Sahara, a contribué à une topographie variée avec différentes élévations, la diversité des types de sols, et une variété de zones climatiques ainsi que des microclimats allant de sec et chaud à tempéré et humide.

Tous ces facteurs ont entraîné une zone géographique relativement vaste avec une flore très variée arrangée à plusieurs usages et traditions. De ce fait, Les vieilles générations algériennes dépendaient fortement de la phytothérapie, et les herbes telles que la sauge, le thym, le romarin, la lavande, la menthe et la camomille étaient couramment cultivées dans les jardins (Bouabdelli et al., 2012).

Ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts et constituent un axe de recherche scientifique, plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles.

A partir des années 80, des équipes Algériennes ont focalisé leurs études sur cette sorte de travaux. Les facultés de Biologie et de Chimie de l'Université Frères Mentouri Constantine ont été les pionniers dans ce domaine. En outre, Des investigations phyto-pharmacologiques ont été étudiées pour avoir des sources naturelles des nouvelles structures chimiques ayant des effets bénéfiques ou protecteurs efficaces contre des différents xénobiotiques (Zama et al., 2007 ; Boubekri et al., 2014 ; Aliouche et al., 2018) ou effets préventifs de quelques maladies (Lassed et al., 2017 ; Bekhouche et al., 2018).

IV.1 Les polyphénols

IV.1.1 Propriétés

Plusieurs investigations ont été focalisées sur les composés phénoliques et essentiellement sur leurs structures chimiques et leurs rôles préventifs probables contre de nombreuses maladies associées aux stress oxydatifs (les maladies cardiovasculaires, neuro- dégénératives et le cancer) (Boussaha et al., 2015 ; Amrani et al., 2017b ; Djebbari et al., 2017; Lahnneche et al., 2017 ; Mecheri et al., 2019). Aussi bien leurs capacités de se lier aux protéines (particulièrement les flavonoïdes), leurs rôles dans la stabilisation des huiles comestibles, la protection de la formation de saveurs et la stabilisation de saveurs, ainsi que leur prédominance dans la préparation de plusieurs compléments alimentaires (Hurtado-Fernandez et al., 2010).

Les composés phénoliques sont largement distribués dans le règne végétal avec plus de 10.000 types identifiés jusqu'à présent. Les trois composés phénoliques les plus abondants sont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les polyphénols.

Les phénols présents soit sous forme conjugués avec de nombreux résidus sucrés, soit liés avec d'autres composés chimiques, comme les acides carboxyliques, les amines ou les lipides ou avec d'autres phénols existants. Les phénols libres sont solubles dans les solvants organiques polaires (alcool, acétone, éther), les solutions d'hydroxyde de Sodium et du carbonate de Sodium. Par contre, les hétérosides sont solubles dans l'eau. Ce sont des composés instables qui peuvent subir une oxydation surtout en milieu alcalin ou isomérisation sous l'action des UV (Pereira, 2012).

IV.1.2 Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires synthétisés par des plantes au cours de leur développement normal. Ils sont produits soit au niveau des chloroplastes comme défense auprès des dommages oxydatifs engendrés lors de la photosynthèse, soit au niveau des organes sexuels comme protecteur du matériel végétal contre des rayons ultra-violet (UV) (Maria et al., 2012). Certains phénols peuvent être produits au niveau de racines comme attractifs pour les symbiotes bactériens et fongiques, ou en réponse à des infections microbiennes (virus, bactéries, champignons) et des blessures des insectes. Ces composés phyto-chimiques provenant de la phénylalanine et la tyrosine sont ubiquitaires dans les plantes (Pereira, 2012).

Aussi bien les composés phénoliques sont des dérivés aromatiques hydroxylés non azotés dont les cycles aromatiques (d'au moins : un Noyau Aromatique lié à un groupement Hydroxyle libre ou engagé) sont originaires de deux voies biogénétiques distinctes soit du métabolisme de l'acide shikimique (acide cinnamique, acide benzénique, coumarines, lignanes, etc.) ou de celui d'un poly acétate (chromones, quinones, etc.). La multiplicité structurale des composés

phénoliques redue à cette double origine biosynthétique est encore développée fréquemment par l'occasion d'une association parallèle du Shikimate et de l'acétate à l'arrangement de composés d'origine mixte (flavonoïdes, stilbènes, Xanthomes, etc.) (Martin et Andrantsitohaina, 2002).

IV.1.3 Classification des polyphénols

Selon le nombre d'atome de carbone et la structure du squelette de base, plusieurs classes de composés phénoliques existent dans les matières végétales sont distinguées, dont les principales sont illustrées dans le tableau suivant:

Tableau 03: Les principales classes de composés phénoliques dans les plantes (Hany, 2017).

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe
6	C6	Phénols simples benzoquinones
7	C6-C1	Acides phénoliques
8	C6-C2	Dérivés d'acétophénonnes tyrosines
9	C6-C3	Acide hydroxycinnamique, coumarines
10	C6-C4	Naphthoquinones
13	C6- C1-C6	Xanthomes
14	C6- C2-C6	Stilbenes
15	C6- C3-C6	Flavonoïdes
18	(C6- C3) 2	Lignans
30	(C6- C3-C6) 2	Bioflavonoïdes
N	(C6- C3-C6) n	Tanins condensés

Les composés phénoliques sont fréquemment simples tels que les flavonoïdes, les stilbènes, les lignans et les acides phénoliques. Ces acides sont des dérivés hydroxylés soit de l'acide benzoïque (C6-C1) comme l'acide salicylique et l'acide gallique, ou de l'acide cinnamique (C6-C3) tel que l'acide caféique et l'acide férulique. Ces derniers se trouvent sous formes conjuguées d'esters et de glycosides et parfois sont libres. Les composés phénoliques peuvent être complexes et particulièrement ont une propriété de combinaison aux protéines (Hany, 2017).

IV.2 Les flavonoïdes

IV.2.1 Caractéristiques

Le terme flavonoïde est dérivé du mot « Flavus » en latin, qui signifie jaune. Les flavonoïdes forment une partie importante des diverses molécules polyphénoliques, dont plus de 6000

structures ont été identifiées. Les flavonoïdes au sens large sont des pigments pratiquement universels des végétaux, leur fonction principale semble être la coloration des plantes. Structurellement, les flavonoïdes sont des composés de faible poids moléculaire, présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles benzéniques C6 « A et B » reliés par un pont en C3. Ce pont forme généralement un troisième cycle pyrone. La distinction des sous-classes se fait sur la conformation de cette structure centrale « C », nous citerons les plus importantes : anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols (Lepiniec et al., 2006 ; Mulvihill et al., 2016 ; Zhang et al., 2018). La figure (07) résume les différents groupes et sous-groupes dérivés des flavonoïdes.

les flavonoïdes sont présents soit sous la forme aglycosylée, ou majoritairement glucosylée au sein des plantes, vu que la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs (protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement solaire) et plus hydrosolubles permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et du mésophiles des feuilles, des parenchymes des tiges et racines (Soares et al., 1997 ; Croft, 1998 ; Heim et al., 2002 cités dans Zhang et al., 2019).

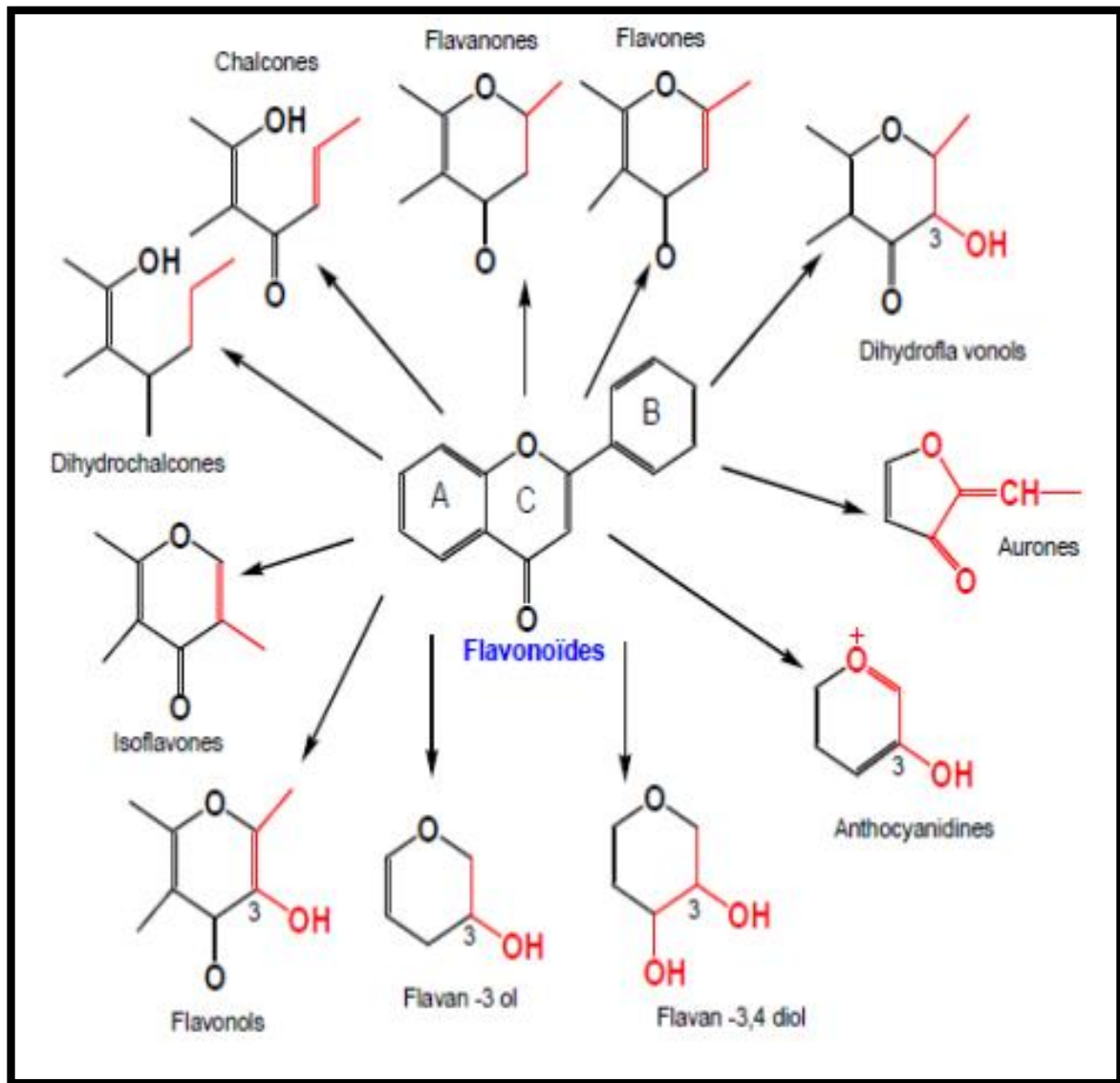


Figure 07 : Représentation des principaux groupes des flavonoïdes (Daroui, 2012).

IV.2.2 Biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse de ces derniers présente un intermédiaire commun, une tétrahydroxychalcone à partir de laquelle se différencient plusieurs types de composés dont les plus importants sont les anthocyanes et les flavones (Maria et al., 2012 ; Ben-Simhon et al., 2015). Par ailleurs, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone, formée par la chalcone synthase à partir du malonyl-CoA, un précurseur de la voie acétate-malonate, et du 4-coumaroyl-CoA, issu de la voie Shikimate (figure 08). Les flavonoïdes peuvent ensuite être modifiés par des réactions d'hydroxylation, méthylation, glycosylation et acylation (Veitch et Grayer, 2011 ; Iwashina, 2015). La concentration des

flavonoïdes est maximale dans les organes jeunes et dans les tissus externes et aériens car la lumière stimule leur biosynthèse.

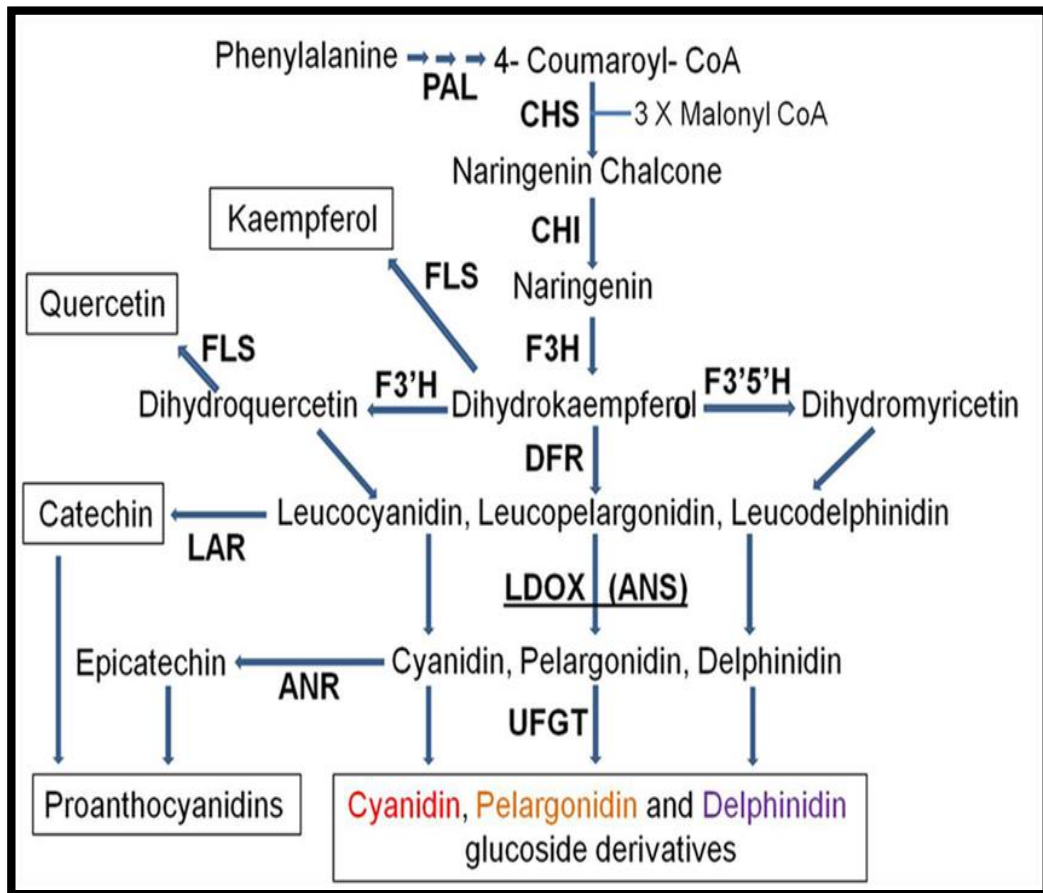


Figure 08 : Biosynthèse des Flavonoïdes (Ben-Simhon et al., 2015).

IV.3 Absorption et métabolisme de polyphénols et de flavonoïdes

La poursuite du métabolisme des polyphénols chez l'homme est cruciale pour déterminer ceux qui sont plus absorbés et ceux qui mènent à la production de métabolites bioactifs. La plupart des polyphénols d'origine végétale doivent subir des transformations intestinales, par le biais du microbiote et des enzymes entérocytaires, afin d'être absorbés aux niveaux des entérocytes et des colonocytes, comme il est illustré dans la figure (09). L'absorption des polyphénols est conditionnée par leur différence de structure et de masse moléculaire (Scalbert, 2001 ; Laura et al., 2015).

Après la consommation des flavonoïdes, un clivage enzymatique (par la lactase phlorizin hydrolase LPH ou la β -glucosidase cytosolique CBG) des fragments de sucre liés au squelette

phénolique avoir lieu à l'intestin grêle. Après l'hydrolyse des flavonoïdes glycosylés, les aglycones pénètrent dans les cellules épithéliales intestinales par diffusion passive (Day et al., 2000).

Tandis que l'hydrolyse des flavonoïdes liés à un fragment ramnose se fait dans le côlon, grâce aux α -rhamnosidases sécrétées par le microbiote (*Bifido bacterium dentium*) pour faciliter son absorption (Bang et al., 2014). En particulier, les flavonoïdes non glycosylés dans les aliments (les catéchines du thé vert) sont simplement absorbés dans l'intestin grêle sans modifications (Nakagawa et al., 1997 ; Amiot et al., 2009).

Certain composés phénoliques acylés par l'acide gallique (épicatéchine) au lieu de se glycosylés sont absorbés au niveau des entérocytes sans aucune déconjugaison ou hydrolyse. Les pro anthocyanidines sont des polymères de haut poids moléculaire, soient absorbés dans l'intestin grêle sous leur forme native (Deprez et al., 2001).

Dans les tissus humains, Il n'y a pas d'estérases capables de briser les liens esters des acides hydroxycinnamiques qui sont généralement estérifiés en sucres, en acides organiques et en lipides. De ce fait, le métabolisme de ces derniers est accompli par le microbiote colique, bien que jusqu'à un tiers de leur absorption puisse pareillement s'effectuer dans l'intestin grêle (Erk et al., 2014). Ainsi, Il y a des acides hydroxycinnamiques (des polymères tel que les ellagitannines) peuvent résister contre la LPH ou la CBG. Mais en arrivant au côlon, le microbiote peut cliver les fragments de conjugaison et métaboliser les aglycones résultants (Landete, 2011).

Après l'absorption des dérivés finals ou aglycons soit à l'intestin grêle ou au côlon, ils subissent un certain degré de métabolisme de phase II au niveau des entérocytes, comme la méthylation, la sulfatation et la glucuronidation. Puis ces produits pénètrent dans le sang par la veine porte, accédant le foie, et soient conjugués et transportés dans la circulation sanguine jusqu'à ce qu'ils se secrètent dans l'urine (Selma et al., 2009 ; Laura et al., 2015). Quelques conjugués hépatiques sont ensuite excrétés en tant que des constituants biliaires dans l'intestin et achevé une recirculation entéro-hépatique. Notamment, les composés déconjugés sont régénérés par des enzymes microbiennes intestinales avant d'être réabsorbés à nouveau. Les métabolites non absorbés sont éliminés par les fèces (Cardona et al., 2013).

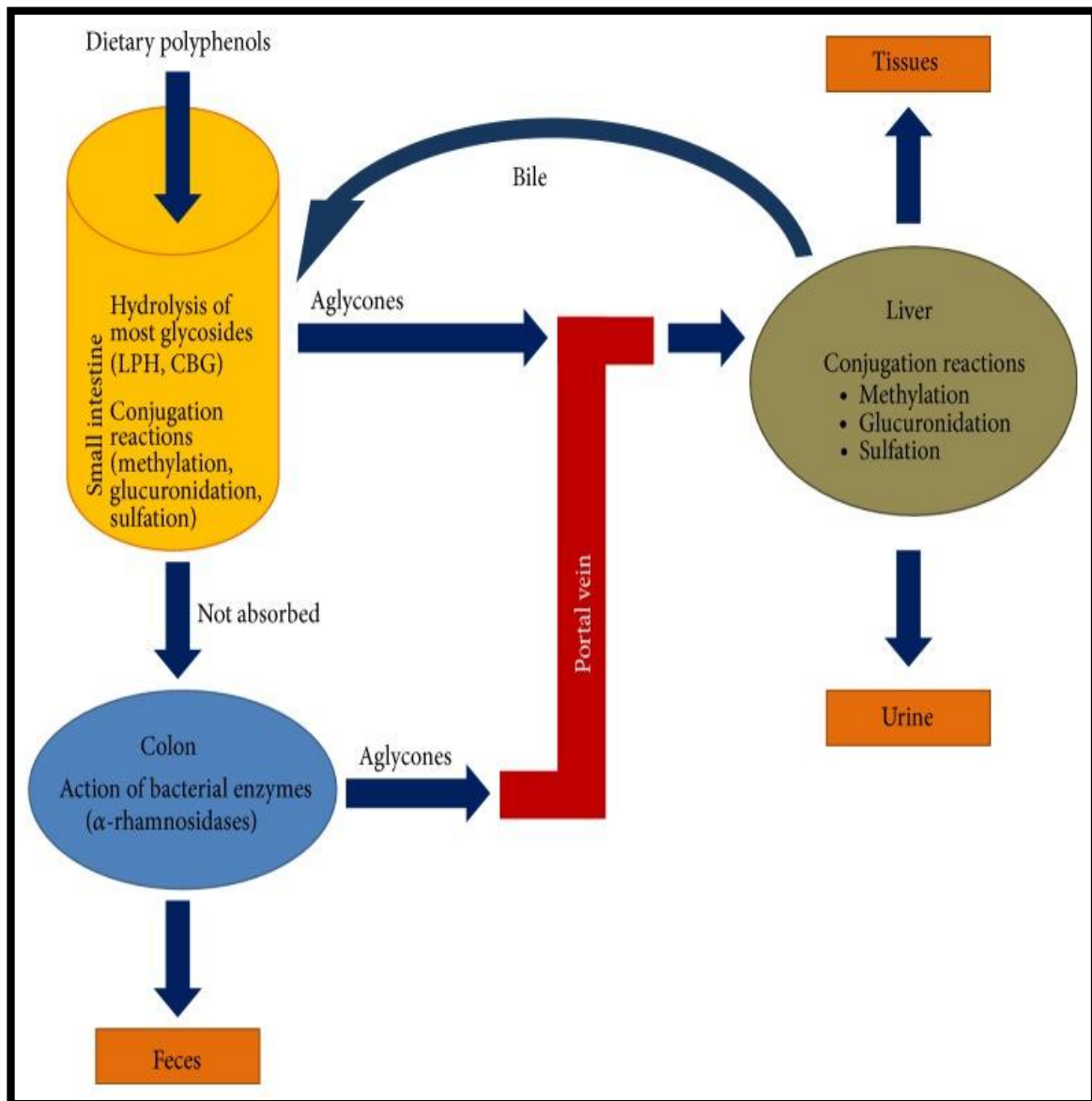


Figure 09: Voies d'absorption et de métabolisme des polyphénols alimentaires et de leurs dérivés chez l'homme (Laura et al., 2015).

IV.4 Effets des polyphénols chez le consommateur

Les polyphénols sont en effet doués de plusieurs propriétés thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et agroalimentaires (Boumaza, 2012 ; Agarra, 2017). Elles jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique (Wang et Brumaghim. 2011 ; Amrani et al., 2017; Azzouzi, 2017). Les effets de polyphénols sur l'organisme sont nombreux, et certains sont encore à découvrir. Ces effets seront dépendant de la quantité absorbée et de la bonne distribution vers les tissus ou cellules

cibles (Azzouzi, 2017). Expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments.

IV.4.1 Effet anticancéreux

Les composés phénoliques peuvent activer les mécanismes naturels de défense anticancéreuse. En effet, les premiers stades de la phase d'initiation cancéreuse peuvent être bloqués par la capacité des tissus cibles à intercepter et à métaboliser les agents mutagènes.

Des cellules telles que les hépatocytes, synthétisent des enzymes nommées de phase I (notamment des monooxygénases, comme les cytochromes P₄₅₀) ont capables d'oxyder les substances mutagènes hydrophobes en produits qui constituent le substrat des enzymes de phase II (glucoronyl transférase, sulfotransférase...), qui transforment ces produits en espèces hydrolysables aisément excrétés hors cellules. Les enzymes de phase I et II agissent pareillement dans la muqueuse intestinale. Elles sont synthétisées sous le fait des composés polyphénoliques trouvées dans l'alimentation (les légumes), ainsi que sous l'action des isothiocyanates, dérivés des glucosinolates (Moein, 2015).

Les effets anticancéreux des polyphénols ont été surveillés sur différents tissus, notamment la bouche, l'estomac, le duodénum, le côlon, le foie, les poumons et la peau. De nombreux polyphénols, tels que la quercétine, les catéchines, les isoflavones, les lignanes, les flavanones, l'acide ellagique, les polyphénols de vin rouge, le resvératrol ou la curcumine, ont montré des effets protecteurs dans différents modèles cancéreux (Cragg et Newman, 2005).

Une récente étude a montré la richesse d'extraits du thé vert en polyphénols et flavonoïdes et la puissante activité antioxydante en diminuant les marqueurs de stress oxydant chez des patients atteints de cancer de la prostate. Pareillement, cette étude a montré l'activité anticancéreuse du thé vert en augmentant la teneur en protéine p53 au niveau des cellules PC-3 (cellules cancéreuses de la prostate) et en provoquant une apoptose au niveau de ces cellules, qui a été confirmée par l'observation par la microscopie vitale (Lassed et al., 2017).

Dans le cancer, les composés polyphénoliques induisent l'apoptose, la réduction du nombre de tumeurs, l'inhibition de l'angiogenèse, la modulation de la multi-résistance aux médicaments et l'activité antiproliférative (Moein, 2015).

IV.4.2 Effet antioxydant

Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Ce principe a été utilisé dans la fabrication de plusieurs

médicaments. La protection contre le stress oxydant est l'effet des polyphénols le plus connu et le plus documenté. De part de leur structure et leur charge, les polyphénols se lient facilement aux molécules chargées et activent les processus d'élimination des radicaux libres comme l'enzyme superoxyde dismutase, et activent les autres antioxydants présents dans le corps (Ozen, 2010 ; Ozen et al., 2011).

Les propriétés biologiques des flavonoïdes sont liées à leur potentiel cytotoxique et à leur capacité à interagir avec les enzymes par la complexation des protéines (Maria et al., 2012). Certains flavonoïdes offrent une protection contre le stress, par exemple, agissant en tant que capteurs de radicaux libres tels que les ERO, ainsi que les métaux chélatants générant des ERO via la réaction de Fenton (Williams et al., 2004).

Les flavonoïdes sont également impliqués dans la résistance à la toxicité de l'aluminium chez le maïs. Les racines des plantes de maïs exposées à l'aluminium exsudaient des taux élevés de composés phénoliques tels que la catéchine et la quercétine; indiquant que leur capacité à chélater les métaux peut constituer un mécanisme *in vivo* d'amélioration de la toxicité de l'aluminium (Maria et al., 2012). La consommation régulière de thé vert pendant une longue période peut protéger les individus des conséquences négatives du stress oxydatif produites pendant la vie (Lassed et al., 2017).

IV.4.3 Effet hépato-protecteur et détoxifiant des xénobiotiques (pesticides)

Les polyphénols ont un effet préventif contre plusieurs maladies et dommages hépatiques. Il a été prouvé que certains phénols tels que les anthocyanines cyanidin-3-O- β -glucoside (C3G) peuvent augmenter l'expression de la glutamate-cystéine ligase catalytique (Gclc) hépatique et en conséquence une diminution de taux d'ERO et de signalisation pro-apoptotique. En outre, le traitement C3G abaisse la peroxydation des lipides hépatiques, inhibe la libération de cytokines pro-inflammatoires, et protège contre le développement d'une stéatose hépatique (Zhu et al., 2012).

La silymarine issue de chardon marie est un flavonoïde (extraites des graines et des fruits) stimulateur de l'activité enzymatique de l'ARN polymérase ADN-dépendante 1 et de la biosynthèse successive de l'ARN, de protéines et puis d'ADN (Agarra, 2017). Plusieurs études phyto-pharmacologiques investiguant le pouvoir hépato-préventifs significatifs des phénols

originaires de nombreux extraits des plantes, contre différents intoxications (Zama et al., 2007 ; Djebbari et al 2017; Lahneche et al., 2017 ; Mecheri et al., 2019).

On compte beaucoup de molécules appelées xénobiotiques, (ce qui signifie étrangères à notre corps), dans l'air que nous respirons, dans les liquides que nous buvons et dans les aliments que nous mangeons. Notre corps se défend par des frontières : la peau et les muqueuses bronchique et digestive. L'intégrité de ces frontières est assurée par une bonne nutrition, en particulier en acide gras et polyphénols. Mais certains xénobiotiques tels que les pesticides peuvent traverser cette barrière de défense et passer dans le sang, où ils pourront ensuite être stockés dans le tissu adipeux, le foie ou le cerveau (Agarra, 2017).

Leur neutralisation dans le foie se fait via la phase I (réactions d'oxydo-réduction) et la phase II (de conjugaison), sous l'action de composés phénoliques consommés (dans l'alimentation). L'activation par le fer du cytochrome P₄₅₀ engendre l'émission de radicaux libres corrosifs. Ainsi il est justifié de ralentir l'activité de ces enzymes pour éviter les dommages provoqués par les substances intermédiaires de ces réactions. Cela est possible avec les polyphénols que l'on trouve dans les fruits et légumes et le thé vert. En exception de la naringénine, un phénol très inhibiteur de cytochromes P₄₅₀ (un polyphénol du pamplemousse) (Moein, 2015 ; Agarra, 2017).

Le foie produit une quantité considérable de glutathion. C'est le principal détoxifiant de l'organisme. Ce dernier intervient à la fois dans les processus de phases I et II et dans la neutralisation des toxiques dans le sang. Le glutathion joue un rôle majeur comme antioxydant et antitoxique direct, comme cofacteur de la glutathion peroxydase et des glutathion transférases, dans la cytoprotection contre le stress oxydatif et les xénobiotiques (Gebel, 2002).

Les catéchines du thé vert sont des stimulateurs puissants de glutathion transférases. Les métabolites secondaires de cette détoxification sont captés par le glutathion et éliminé dans les urines sous l'action des polyphénols (figure 10). La plupart des polyphénols ont des effets protecteurs contre les xénobiotiques par induction des glutathion transférases, et dans certains cas, inhibition des cytochromes P₄₅₀ (Kang et al., 2005). Par exemple, les composés phénoliques existants dans le thé vert s'avèrent être capables de multiplier par 10 la capacité du glutathion à éliminer des toxiques dans les urines (Tang et al., 2008).

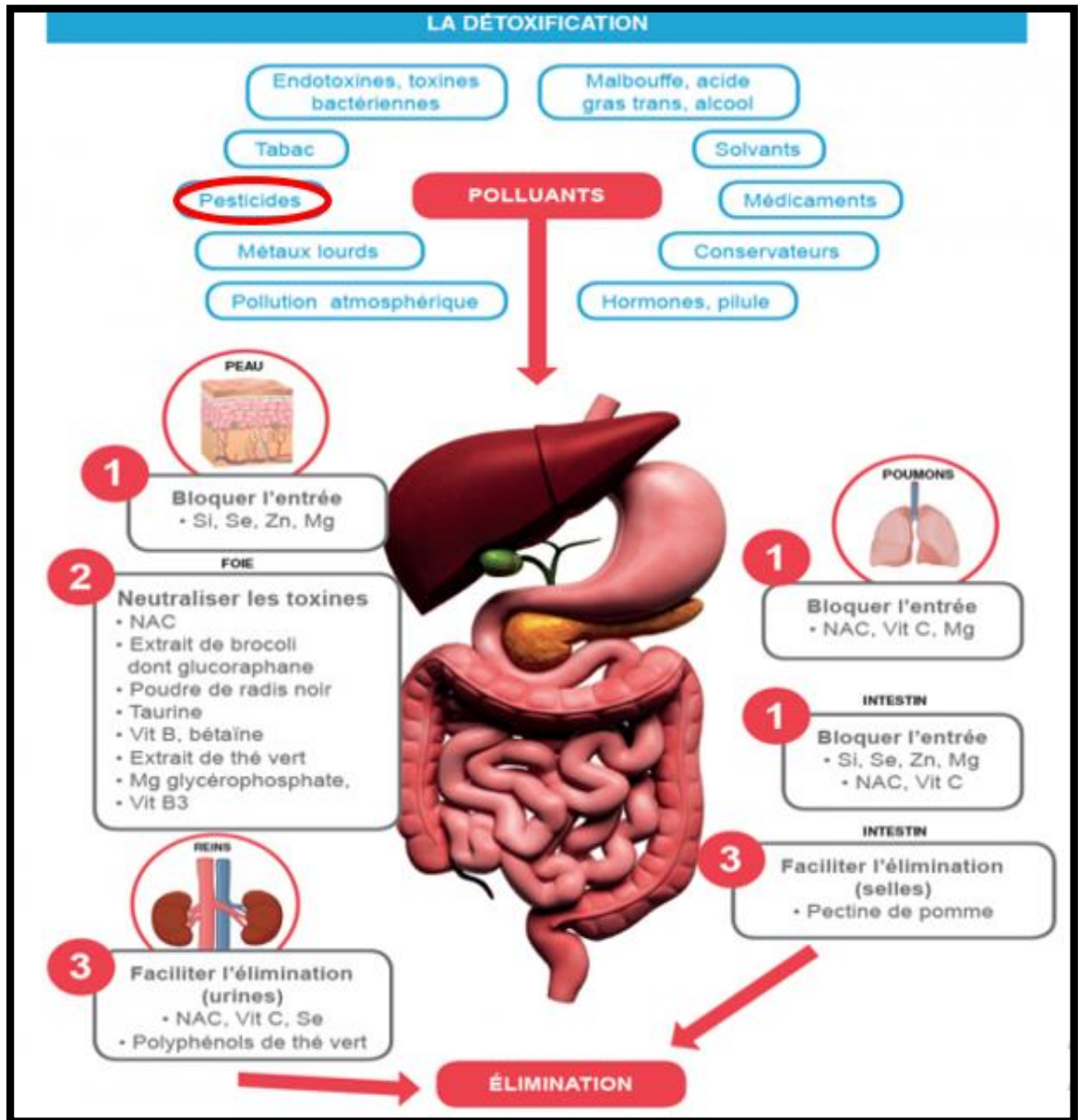


Figure 10: Intérêt des composés bioactifs et polyphénols dans la détoxification des xénobiotiques (Agarra, 2017).

1- Etude expérimental de la plante :

Perralderia coronopifolia Coss

Etude expérimental de la plante : *Perralderia coronopifolia* Coss

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

➤ Nom de la plante : *Perralderia coronopifolia* Coss

I.1.1. Classification systématique de la plante

Tableau 04 : Classification systématique de la plante *P. coronopifolia* Coss.

Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Perralderia</i>
Espèce	<i>Perralderia coronopifolia</i>
Sub species	eu-coronopifolia M
Variété	tipyca M

I.1.2. Nom et usage traditionnels

Espèces dite : لحية التيس, Lahiet et-tis, Aouarhad, Tafr'a, Thafes, Tirghet. La plante est utilisée traditionnellement par les sahariens pour épiler les peaux avant le Tannage.

I.1.3. distribution

Espèce endémique saharienne commune au Sahara septentrional et occidental, présente également au Tassili n'Ajjer.

I.1.4. Description

Plante en touffe érigée bien feuillée. Tiges velues, glanduleuses et jaunâtres. Les feuilles sont un peu charnu, divisées en lanières étroites. Les fleurs sont toutes en tube de couleur jaune à rouge

pourpré. Les bractées dépassent plus ou moins les pétales et sont déployés vers l'extérieur. Les achaines rousses portent de longs poils, les poils de l'aigrette externe sont courts, ceux de l'aigrette interne sont longs, fragiles et de longueurs inégales. La taille est entre 15 à 50 cm.

Dans la flore d'Ozenda, l'espèce est mentionnée pour être à fleurs jaunes pourprées et à feuilles deux fois divisées étant propre au Sud oranais et marocain.

I.1.5. Récolte

Le matériel végétal (*P. coronopifolia*) a été récolté en 2011 dans une région élevée située autour de Taghit dans le sud-ouest de l'Algérie. Il a été authentifié par Mr *Mohamed Benabdelhakem*, directeur de l'organisation de préservation de la faune de Béchar. Des spécimens ont été déposés à l'unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives, Analyses Physico-Chimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Frères Mentouri Constantine1.

I.1.6. Extraction

L'extraction est réalisée par Dr *Boussaha Sara*, au Laboratoire d'Unité de VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri Constantine 1. Constantine, Algérie.

Les parties aériennes, feuilles et fleurs (1400 g) de *Perralderia coronopifolia*, sont broyées, puis mises à macérer dans un mélange hydroalcoolique Ethanol/Eau (80:20, v/v) pendant 48 heures. L'opération a été répétée trois fois avec renouvellement du solvant, et a duré à chaque fois 48 heures.

Après filtration, les trois solutions hydroalcooliques sont réunies puis concentrées sous vide à une température n'excédant pas 35 °C. L'extrait obtenu est dilué avec l'eau distillée à raison de 400 mL pour 1 Kg de matière sèche sous agitation magnétique. La solution ainsi obtenue, est laissée pendant une nuit au frais puis filtrée. Le filtrat subit une extraction de type liquide-liquide dans une ampoule à décanter, en utilisant des solvants de polarité croissante, en commençant par le chloroforme, ensuite l'acétate d'éthyle, et en dernier le *n*-butanol.

Les phases organiques récupérées sont séchées avec Na₂SO₄ Anhydre puis filtrées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Les rendements des phases organiques sont donnés dans le tableau suivant (05) (Boussaha et al., 2015).

Tableau 05: Rendement des différents extraits des parties aériennes de *P. coronopifolia* (Boussaha et al., 2015).

Matériel végétal (1400 g)	Extrait Chlorofome	Extrait Acétate d'éthyle	Extrait <i>n</i> -butanol
Poids (g)	2	7	40
Rendement (%)	0,14	0.5	2,86

I.1.7. Composition

Les composants principaux de l'extrait d'éthyle d'acétate sont les flavonoïdes tel que : le chrysoptérol D, les dérivés de la taxifoline et de l'acide caféoylquinique (Boussaha et al., 2015).

I.2. Animaux

Les animaux d'expérience sont des rattes femelles adultes Wistar Albinos (n= 36, âge moyenne= 48±5 jours) pesant 150 ± 18 g. Dès leurs réceptions, de l'Unité de recherche des animaux de laboratoire d'OMUDEHAM (Université Ondokuz Mayıs, Samsun, Comité d'éthique des animaux de Turquie), les rattes sont placées aléatoirement en groupe de 6 dans des cages standards pour une période d'acclimatation (2 semaines) avant d'être utilisés dans des différentes expériences. Pendant cette période les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau (pastilles de rat standard), ils sont maintenus dans une animalerie à une température constante (22 ± 2) °C à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. C'est expériences ont été réalisées on suivant la directive de la Communauté européenne (86 / 609 / CEE) et les règles nationales sur les soins aux animaux.

I.3. Les tests *In vitro*

Cette étude est effectuée en utilisant les extraits d'éthyle d'acétate et de *n*-butanol de la plante *P. coronopifolia* (EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC).

I.3.1. Propriétés antioxydantes

I.3.1.1. Détermination des phénols totaux et des flavonoïdes

L'évaluation des polyphénols dans les deux extraits de la plante *P. coronopifolia* est réalisée par le Folin–Ciocalteus selon la méthode de (Singleton et al., 1999). 100 µL de réactif de Folin Ciocalteus et 1,580 mL d'eau distillée ont été mélangés avec 20 µL d'extrait. Après 3 à 8 minutes, 0,3 mL de Na₂CO₃ a été ajouté. L'absorbance de l'échantillon a été lue à 765 nm après 30 minutes

d'incubation à 37 ° C. La concentration totale en composés phénoliques de l'extrait a été quantifiée en µg d'équivalent acide gallique (GAE) / 1 mg de matériel végétal.

L'évaluation quantitative des flavonoïdes est réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (Wang et al., 2008). Brièvement, on mélange 0,5 mL de l'extrait (0,1%) avec 0,5 mL d'AlCl₃ et on les laisse agir pendant une heure d'où la densité optique est lue à 430 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. La quercétine a été utilisée comme standard. La teneur en composés flavonoïdes des extraits a été estimée en µg d'équivalent quercétine (QE) / 1 mg de matériel végétal.

I.3.1.2. Détermination de l'activité antioxydante totale

L'activité antioxydante de chaque extrait a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant la méthode de phosphomolybdène (Prieto et al., 1999). La solution d'extrait (0,3 mL) a été mélangée avec 2,7 mL de la solution de réactif préparée dans du molybdate d'ammonium (4 mM), de l'acide sulfurique (0,6 M) et du phosphate de sodium (28 mM).

L'échantillon et les solutions étalons ont été incubés à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement des échantillons à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 695 nm. Pour le blanc, il suffit de remplacer l'échantillon par 0,3 mL d'éthanol. L'activité a été définie comme l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon. Une valeur d'absorbance plus élevée indique une capacité antioxydante plus élevée.

I.3.1.3. Détermination de la puissance réductrice

Le pouvoir réducteur de chaque extrait et des antioxydants standards a été mesuré par spectrophotométrie en utilisant la méthode d'Oyaizu, 1986. 1 mL des solutions d'échantillon (50-500 µg / mL) a été ajouté à 2,5 mL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et de ferricyanure de potassium (1%, 2,5 mL). Les mélanges ont été incubés à 50 °C pendant 20 minutes. Les mélanges ont été centrifugés à 1000 x g pendant 20 minutes après addition 2,5 mL d'acide trichloroacétique (10%). Le surnageant (2,5 mL) a été ajouté à 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de chlorure ferrique (0,1%). L'absorbance a été lue à 700 nm.

I.3.1.4. Détermination de l'activité de piégeage H₂O₂

L'activité de piégeage de H₂O₂ a été mesurée en utilisant la méthode légèrement modifiée de Zhao et al., 2006. 1 mL d'échantillon a été mélangé avec 1 mL du H₂O₂ (0,1 mM), 100 µL du molybdate d'ammonium (3%), 10 mL du H₂SO₄ (2 M) et KI (1,8 M). Finalement, le mélange a été

titré en utilisant $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (5 mM) jusqu'à disparition de la couleur jaune. Le pourcentage d'effet de piégeage a été calculé en utilisant la formule donnée ci-dessous:

$$\text{Activité de piégeage de H}_2\text{O}_2, \% = [(V_{\text{control}} - V_{\text{test}}) / V_{\text{control}}] \times 100$$

Où : V_{control} est le volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ et V_{test} est le volume de solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ ajouté aux échantillons d'essai.

I.3.1.5. Détermination de l'activité de chélation de métaux

L'activité de chélation Fe^{+2} de différents extraits et des antioxydants standards a été mesurée par la méthode décrite par Dinis et al., 1994. Les différentes concentrations (50-500 $\mu\text{g} / \text{mL}$) de l'échantillon ont été ajoutées séparément à 0,05 mL de FeCl_2 (2 mM) et laissées pour incubation à température ambiante pendant 5 min. La réaction a été démarrée en ajoutant 0,3 mL la ferrozine (5 mM). Après agitation énergique, le mélange a été incubé pour une durée de 10 minutes à température ambiante. L'EDTA a été utilisé comme témoin positif et l'absorbance a été enregistré à 562 nm. Le pourcentage d'inhibition de la création du complexe ferrozine- Fe^{+2} a été mesuré comme la formule suivante:

$$\text{Capacité de chélation (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Où : A_0 est l'absorbance du complexe Fe^{+2} -ferrozine (témoin) et A_1 est l'absorbance des solutions d'essai.

I.3.1.6. Détermination de l'activité de piégeage de DPPH \cdot

Le test de piégeage DPPH \cdot a été effectué selon la méthode de (Braca et al., 2001). 3 mL d'une solution de DPPH \cdot ont été mélangés avec 1 mL d'échantillon à diverses concentrations (1 à 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité dans la pièce, l'absorbance a été mesuré à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition a été déterminé en utilisant la formule suivante:

$$\text{Inhibition, \%} = (1 - A_1 / A_0) \times 100$$

Où : A_0 : Absorbance de la solution de DPPH seule. A_1 : Absorbance de la solution de DPPH plus l'extrait ou la vitamine C.

I.3.1.7. Détermination de Piégeage du radical hydroxyle (OH \cdot)

La capacité des extraits à piéger le OH \cdot a été évaluée selon la méthode de Wang et al., 2008 avec quelques modifications. 0.5 mL de FeSO_4 (8 mM) a été mélangé avec 0.8 mL de H_2O_2 (6 mM). Ensuite 0.5 mL d'eau distillée est ajouté suivi par des concentrations croissantes des

différents extraits ou de vitamine C et 0.2 mL de salicylate de sodium (6 mM). Les échantillons ont été mélangés puis incubés à 37 °C pendant 1 h. L'absorbance a été mesurée à 562 nm. La vitamine C a été utilisée comme contrôle positif et le pourcentage d'activité de piégeage du radical hydroxyle (OH[·]) a été calculé en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Activité de piégeage du radical hydroxyle \%} = [1 - (A_1 - A_0) A_2] \times 100$$

Où: A₀: Absorbance du témoin (sans extrait ou vitamine C), A₁: Absorbance de l'échantillon plus l'extrait ou la vitamine C, A₂: Absorbance de l'échantillon sans salicylate de sodium.

Les concentrations inhibitrices médianes (IC₅₀) des différents extraits et de la vitamine C ont été calculées à partir des équations des courbes de tendances linéaires obtenues des graphiques de la variation du pourcentage d'inhibition du radical hydroxyle (OH[·]) (I %) en fonction des concentrations croissantes des extraits et de la vitamine C.

I.3.1.8. Détermination de l'efficacité d'inhibition de la peroxydation lipidique (LPO)

La capacité des extraits à inhiber la peroxydation lipidique a été évaluée selon le protocole modifié de Cao et Ikeda, 2009 en utilisant le vitellus d'œuf comme source riche en lipides. 0.5 mL d'homogénat de vitellus d'œuf à 10%, 50 µL de FeSO₄ (0.07 M) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé avec des concentrations croissantes des extraits et de la vitamine C à 37 °C pendant une heure.

Après incubation, on ajoute successivement 1 mL d'acide trichloracétique (TCA, 20%) et 1.5 mL d'acide thiobarbiturique (TBA, 1%). Les échantillons ont été mélangés puis incubés une deuxième fois pendant 15 minutes à 95 °C. Après centrifugation à 400 g pendant 20 min, l'absorbance du surnageant a été mesurée à 532 nm. La vitamine C a été utilisée comme contrôle positif et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique (I %) a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO) (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Où A₀ est l'absorbance de témoin (sans extrait de thé vert ou vitamine C) et A₁ est l'absorbance de l'échantillon plus de l'extrait ou de la vitamine C.

Les concentrations inhibitrices médianes (IC₅₀) des différents extraits et de la vitamine C ont été calculées à partir des équations des courbes de tendances linéaires obtenues des graphiques de la variation du pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique (I %) en fonction des concentrations croissantes des extraits et de la vitamine C.

I.3.2. L'inhibition des dommages à l'ADN

La capacité de protection de l'ADN par les extraits a été estimée en utilisant l'ADN plasmidique 46966 photolysé (extrait d'*Echerichia coli*) par rayonnement UV en présence de H₂O₂ et la performance de l'électrophorèse sur gel d'agarose avec l'ADN irradié (Russo et al., 2001). 1 µL d'aliqotes de plasmide 46966 (20 µg / mL) ont été placés dans des tubes de micro-centrifugation en polyethylene, puis 50 µg de chaque extrait ont été ajoutés à un seul tube. Le tube qui ne contient pas d'extrait est servi comme contrôle irradié (C_R).

Ensuite, 4 µL de H₂O₂ (3%) ont été ajoutés dans des tubes (y compris C_R). Les tubes ont été placés sur la face externe d'un transilluminateur UV (300 nm) et irradiés à température ambiante pendant 10 mn. Le troisième tube contient des aliqotes de 1 µL d'ADN plasmidique 46966 qui a également été placé comme témoin non irradié (C_O). Les échantillons ont été passés sur un gel d'agarose (1%) et photographiés en utilisant un système d'imagerie par gel de Lourmat (Vilber).

I.3.3. Activité anti proliférative

I.3.3.1. Préparation de culture

Des cellules HeLa (human cervix carcinoma) et C6 (rat brain tumor) ont été développées dans DMEM-HG (milieu d'aigle modifié de Dulbecco) avec 10% (v / v) de FBS (sérum foetal bovin) et 2% de pénicilline / streptomycine-C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂, au niveau du laboratoire de recherche de plante, du département de chimie de l'université de Çankiri Karatekin, Çankiri, Turquie.

Les cellules HeLa et C6 ont été détachées du fond du flacon de culture en utilisant 10 mL de mélange trypsine-EDTA. Après décollage, le même volume de milieu de culture a été ajouté et mélangé soigneusement puis centrifugé (Nüve NF 800, Turquie). 5 mL de milieu ont été mélangés avec le surnageant. La concentration des cellules dans cette suspension a été déterminée en utilisant CEDEX HIRES Cell Counter.

I.3.3.2. Détermination de l'activité antiproliférative par le système xCELLigence

L'instrument analyseur de cellules en temps réel - plaque unique xCELLigence RTCA-SP est utilisé pour évaluer les effets antiprolifératifs de différents extraits sur les cellules HeLa (cancer du col de l'utérus humain) et C6 (tumeur cérébrale de rat). 50 µL du milieu ont été placés dans chaque puits de la plaque E 96 et laissés dans l'enceinte stérile pendant 15 minutes, puis incubés pendant 15 minutes. 100 µL de la suspension cellulaire (2,5 x 10⁴ cellules/100µL) ont été placés dans des puits. Exceptionnellement, 100 µL de 5-florourasil (5-FU) ont été ajoutés comme contrôle

dans les derniers puits. En suite la plaque a été incubée dans la hotte pendant 30 min pour faire adhérer cellules vers le bas, puis attachée à la station xCELLigence RTCA-SP dans l'incubateur. Une mesure pendant 80 min a été enregistrée.

Les solutions d'extrait (250, 100 et 50 µg / mL) dans du DMSO ont été injectées dans les puits et ajustées jusqu'à 200 µL en utilisant un milieu de culture. Le contrôle et les puits moyens n'ont pas de solutions d'extrait. Ensuite, la plaque a été insérée dans la station xCELLigence dans l'incubateur et une mesure a été commencée pendant 48 h.

I.3.3.3. Test de prolifération cellulaire : ELISA-BrdU Cell Proliferation

Les cellules ont été étalées dans des plaques de culture à 96 puits (COSTAR, Corning, USA) à une densité de 30 000 cellules par puits. Du véhicule (DMSO), du 5-fluorouracile, du cis platine et plusieurs échantillons à diverses concentrations (5-100 µg / mL) ont été ajoutés à chaque puits. Ensuite les cellules ont été incubées pendant une nuit avant d'appliquer le réactif de marquage ELISA-BrdU Cell Proliferation (Roche, Allemagne) selon la procédure du fabricant.

En bref, les cellules ont été puisées avec le réactif de marquage BrdU pendant 4 h, puis fixées dans une solution de FixDenat pendant 30 minutes à température ambiante. Après, les cellules ont été incubées avec une dilution au 1/100 d'anti-BrdU-POD pendant 1,30 h à température ambiante. La quantité de prolifération cellulaire a été évaluée en déterminant la densité optique à 450 nm du milieu de culture après addition de la solution de substrat en utilisant un lecteur de microplaque (Ryto, Chine).

Les résultats ont été rapportés en pourcentage de l'inhibition de la prolifération cellulaire, où la densité optique mesurée à partir des cellules traitées avec le véhicule était considérée comme étant égale à 100% de la prolifération. Tous les tests ont été répétés au moins deux fois en utilisant des cellules HeLa et C6. Le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire a été calculé comme suit en utilisant la formule suivante:

$$\text{L'inhibition de la prolifération cellulaire}\% = [1 - (A_{\text{treatments}} / A_{\text{vehicle control}})] \times 100.$$

La solution mère des échantillons, le 5-fluorouracile, a été dissoute dans du DMSO stérile et diluée dans le milieu de culture (DMEM: 1:20). La concentration finale de DMSO doit être inférieure à 1% dans tous les tests. Les mesures ont été effectuées pendant 48 heures.

I.3.3.4. Test de fuite du lactate déshydrogénase (LDH)

Le test de fuite du LDH a été réalisé en utilisant un kit de détection de la cytotoxicité LDH par Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne, selon le protocole dans le manuel de l'utilisateur. A une concentration de 100 µg / mL qui était la dose la plus élevée au test d'activité antiproliférative, on a déterminé la cytotoxicité (%) des extraits contre la lignée cellulaire C6. 5-FU a été utilisé comme contrôle positif.

Les échantillons et le 5-FU ont été incubés avec 100 µL de suspension de cellules C6 ayant 5×10^3 cellules / mL dans une plaque à 96 puits à 37 °C pendant une nuit dans une atmosphère de 5% de CO₂. Toutes les substances de contrôle ont été testées en triple et deux fois et la moyenne ± SEM de la valeur d'absorbance a été prise pour calculer la cytotoxicité en utilisant la formule suivante :

$$\text{Cytotoxicité\%} = (A_{\text{échantillon}} - A_{\text{contrôle faible}}) / (A_{\text{Contrôle élevé}} - A_{\text{contrôle faible}}) \times 100$$

I.4. Les tests *in vivo*

Cette étude est effectuée en utilisant l'extrait *n*-butanolique de la plante *P. coronopifolia* (*n*-BuOH-PC), le pentachlorophénole (PCP) comme xénobiotique induisant la toxicité et la vitamine E (standard antioxydant) comme témoin positif.

I.4.1. Traitement des animaux

Le PCP (20 mg/kg de poids corporel) et / ou l'extrait de plante (50 mg/kg de poids corporel) ont été administrés quotidiennement par gavage pendant deux semaines. La vitamine E est utilisée comme control positif avec une dose de 100 mg/kg par injection péritonéale.

Les rattes ont été pesées et divisées en six groupes, chaque groupe contient six rattes (n = 6):

- ✓ Le groupe I a été servi comme contrôle négatif.
- ✓ Le groupe II (PCP) a reçu le PCP 20 mg/kg pendant deux semaines.
- ✓ Le groupe III (EXT50) a reçu l'extrait par gavage à la dose 50 mg/kg pendant deux semaines.
- ✓ Le groupe IV (EXT50 + PCP) a été traité par l'extrait de plante à la dose 50 mg/kg et le PCP 20 mg/kg pendant deux semaines.
- ✓ Groupe V (VITE) a été traité par la vitamine E à 100 mg / kg, ce groupe a été désigné comme groupe témoin positif pendant deux semaines.

- ✓ Groupe VI (VITE + PCP) a été traité par la vitamine E à 100 mg / kg par et PCP à 20 mg / kg (VITE + PCP) pour deux semaines.

Les animaux ont été pesés tous les matins durant les deux semaines de traitement. Les résultats enregistrés ont permis d'évaluer progressivement la variation des poids corporels des rats.

I.4.2. Dissection des rats, prélèvement du sang et préparation des homogénats tissulaires

Après les différents traitements, les rats sont anesthésiés avec une injection du chlorhydrate de kétamine (1 mL / 100 mg) et de xylazine (1 mL / 23.32 mg). Ensuite et après la dissection, le sang est collecté à partir de la veine porte dans des tubes héparinés. Puis ils ont été immédiatement perfusés avec une solution de KCL (1.15%) (+4 °C) afin de drainer tout le sang restant dans les organes. Les organes (foies, reins et cœur) sont ensuite prélevés, débarrassés de l'excès de graisse, séchés avec du papier filtre préalablement. Les organes sont coupés en petits morceaux, pesés, homogénéisés avec du KCl froid à 1.15% pour former un homogénat à 20%. Le surnageant séparé a été utilisé pour des analyses de toutes les enzymes antioxydantes et a conservé un réfrigérateur à -80 °C pour une analyse plus poussée. La teneur en protéine dans le surnageant a été déterminée par la méthode colorimétrique de Lowry et al., 1951. Le BSA a été utilisé comme standard.

I.4.3. Évaluation du taux de malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique est estimée dans le surnageant de tous des homogénats des différents organes. Il a été évalué en mesurant la formation de TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) selon la méthode colorimétrique d'Uchiyama et Mihara, 1978. Le MDA est l'un des produits terminaux de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) par les radicaux libres libérés au cours de stress. En milieu acide et à chaud (100°C) une molécule d'MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique acide (TBA) pour former un complexe coloré en rose.

Dans un tube de centrifugation, un volume de 0,5 mL d'homogénat (20%), 3 mL d'acide phosphorique (1%) et 1 mL de TBA (0,67%). Le mélange est incubé dans un bain marri à 100 °C pendant 45 minutes, puis refroidi à température ambiante. 4 mL de *n*-butanol ont été ajoutés au mélange et mélangés énergiquement. L'absorbance a été lue à 532 nm après séparation de la phase *n*-butanol par centrifugation. MDA a été employé seul comme standard. La teneur en TBARS dans l'homogénat était donnée par g de tissu.

I.4.4. Évaluation du taux du glutathion (GSH)

Le dosage du GSH est basé selon la méthode colorimétrique d'Ellman, 1959. Son principe est fondé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB), libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB). Un volume de 3 mL de mélange de dilution additionné à 20 µL de DTNB (0,01 M), l'absorbance est mesurée à 412 nm. Les concentrations sont exprimées en nmol / gramme de tissu.

I.4.5. Évaluation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase GPx

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler (1984). Pour cela le mélange des composants de 0,2 mL d'homogénat et 0,4 mL de GSH (0,1 mM) plus 0,2 mL de solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH: 7,4), sont incubés au bain marie à 25 °C pendant 5 min. Pour initier la réaction, on rajoute 0,2 mL d'H₂O₂ (1,3 mM) et après centrifugation, on récupère le surnageant pour additionner le DTNB et faire la lecture à 412 nm. Les concentrations sont exprimées en (µmol GSH / mg protéine).

I.4.6. Dosage de paramètres biochimiques

Le sérum a été utilisé pour l'analyse des paramètres : des glutamates oxaloacétate transaminases et de glutamate pyruvate transaminases (AST et ALT), cholestérol, triglycérides, bilirubines totaux, urée et créatinine. Les paramètres biochimiques ont été effectués en utilisant des kits (obtenus à de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université Ondokuz Mayıs, Samsun, Turquie) et Audit Diagnostics Instrument, Irlande.

I.5. Analyse statistique

Toutes les recherches ont été réalisées dans chaque test en trois répétitions. Les résultats sont donnés sous forme de moyennes ± déviation standard de la moyenne (SDM). Les analyses ont été exécutées par le logiciel SPSS V.18 (Statistical Package for the Social Sciences) et évaluées par le test t. Les valeurs de p <0,01 et 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

Les résultats de la culture cellulaire sont les moyennes ± SDM de six mesures pour chaque type cellulaire. Les différences entre les groupes de traitement ont été comparées par analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) et les valeurs P <0,01 et 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

II. Résultats et discussion

II.1. Tests *in vitro*

II.1.1. Propriétés antioxydantes

II.1.1.1. Contenu de Polyphénols et de flavonoïdes

Les résultats de dosage des polyphénols dans les extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia* révèlent que ces extraits contiennent des quantités élevées de composés phénoliques, présentée en μg d'équivalent acide gallique (GAE) par mg de matière végétale. Les valeurs sont 444 ± 0.89 et 424.67 ± 4.03 μg GAE / mg d'extrait, respectivement (Figure 11).

D'autre part, l'évaluation quantitative des flavonoïdes a montré que les deux extraits contiennent des quantités importantes des flavonoïdes, présentée en μg d'équivalents de quercétine (QE) par mg de matériel végétal. Les extraits EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC contiennent respectivement 400.33 ± 0.51 et 347.67 ± 2.25 μg QE / mg d'extrait (Figure 11).

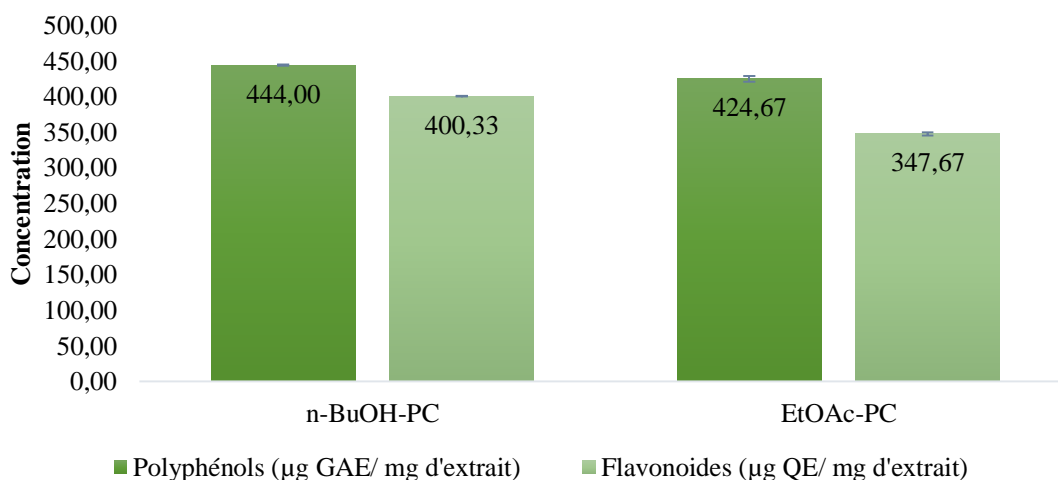


Figure 11 : Teneur des extraits acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia* en phénols et flavonoïdes. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 3).

II.1.1.2. Activité antioxydante totale

Les résultats reportés dans le tableau (06a) ont montré que les extraits EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC de la plante *P. coronopifolia* présentent une activité antioxydante totale significativement supérieure celle des standards antioxydants utilisés comme témoins positifs : vitamine C et BHA (hydroxyanisole butylé).

Tableau 06a : Activité antioxydante totale des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia*. Les valeurs sont des moyennes ± écart type (n= 6). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 par rapport aux standards antioxydants (vitamine C et BHA).

Echantillon	Activité antioxydante			
	3 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹	500 µg mL ⁻¹
Activité antioxydante totale, 695 nm				
<i>n</i>-BuOH-PC	0.034±0.008*	0.243±0.014	1.456±0.064**	2.982±0.103*
EtOAc-PC	0.04±0.02	0.27±0.02	1.23±0.09*	2.84±0.03*
Vitamine C	0.042±0.020	0.294±0.013	0.999±0.065	2.699±0.019
BHA	0.074±0.009	0.193±0.021	0.683±0.024	1.511±0.056

II.1.1.3. Puissance réductrice

Selon les résultats reportés dans le tableau (06b), les extraits EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC de la plante *P. coronopifolia* ont un pouvoir réducteur plus fort comparable à ceux des standards antioxydants utilisés comme témoins positifs : trolox, BHA et vitamine C. Il est augmenté significativement avec des concentrations élevées (p <0,05).

Tableau 04b : Pouvoir réducteur des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia*. Les valeurs sont des moyennes ± écart type (n= 6). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 par rapport aux standards antioxydants (vitamine C, BHA et trolox).

Echantillon	Activité antioxydante			
	3 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹	500 µg mL ⁻¹
Puissance réductrice, 700 nm				
<i>n</i>-BuOH-PC	0.155±0.009*	0.107±0.005	0.209±0.011**	0.388±0.008***
EtOAc-PC	0.30±0.01	0.47±0.01	1.14±0.02	1.93±0.09
Vitamine C	0.545±0.005	1.129±0.030	3.496±0.211	3.817±0.049
BHA	0.336±0.014	0.587±0.015	1.158±0.129	3.496±0.047
Trolox	0.192±0.009	0.373±0.010	0.914±0.048	1.880±0.096

II.1.1.4. Activité de piégeage de H₂O₂

Les résultats illustrés dans le tableau (06c) indiquent que les deux extraits (EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC) ont une activité de piégeage de H₂O₂ plus élevée que certains antioxydants standard : trolox, BHA et vitamine E (p < 0,05).

Tableau 06c: Piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia*. Les valeurs sont des moyennes ± écart type (n= 6). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 par rapport aux standards antioxydants (vitamine C, vitamine E, BHA et trolox).

Echantillon	Activité antioxydante			
	3 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹	500 µg mL ⁻¹
Activité de piégeage de H₂O₂, %				
<i>n</i>-BuOH-PC	31.74±3.16	38.88±2.69	47.61±0.87	65.57±0.53
EtOAc-PC	22.22± 3.51	33.33±4.26*	42.06±1.23*	50.79±2.46
Vitamine C	17.46±0.75	34.09±2.08	53.96±0.94	66.66±0.57
Vitamine E	30.15±0.94	38.09±0.96	47.61±3.64	55.56±0.82
BHA	25.39±3.23	41.26±3.85	50.79±4.07	60.31±3.82
Trolox	31.70±2.05	41.25±0.77	46.03±2.67	50.79±0.62

II.1.1.5. Activité chélatante des métaux

Les résultats reportés dans le tableau (06d) permet de constater que le pouvoir chélateur des métaux par les extraits EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC est supérieure à celle du BHA et de la vitamine C à la dose 100 µg / mL et à 250 µg / mL.

Tableau 06d : Activité de chélation des métaux des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia*. Les valeurs sont des moyennes ± écart type (n= 6). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 par rapport aux standards antioxydants (EDTA, vitamine C, vitamine E et BHA).

Echantillon	Activité antioxydante			
	3 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹	500 µg mL ⁻¹
Activité de chélation de métaux, %				
<i>n</i>-BuOH-PC	7.87±1.34	29.21±0.67*	41.70±2.04*	50.94±1.21

EtOAc-PC	8.11±0.6	28.59±2.12*	41.82±1.51*	48.19±1.6
EDTA	10.24±1.34	21.85±0.67	37.45±3.04	45.94±1.21
Vitamine C	6.49±2.71	10.61±0.51	23.22±1.16	40.57±0.77
Vitamine E	6.24±1.27	8.86±1.84	20.22±2.07	23.60±3.16
BHA	2.12±0.39	21.10±0.70	36.83±3.67	52.56±1.84

II.1.1.6. Activité de piégeage de DPPH

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 12 et permettent de tracer les courbes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour les différents extraits.

Ces courbes montrent que les activités anti-radicalaires des extraits EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC vis-à-vis du radical DPPH[•] sont très importantes et sont dose dépendante. Ces résultats montrent que ces extraits sont des puissants antioxydants avec une diminution dose-dépendante du radical DPPH[•]. Ces courbes permet aussi de tirer des véritables constations repérées dans les points suivants: Les extraits ont :

- Un pouvoir anti-radicalaire plus élevé (90%) observé avec une dose de 25 µg /mL de chaque extrait ; pouvoir équivalent à celui qu'exerce la vitamine C (94%) à la même concentration.
- Un pouvoir piégeur de 50% du radical DPPH avec seulement une dose de 07 µg / mL de chaque extrait. Cette activité est importante comparant à celle obtenus avec la vitamine C dans les mêmes conditions (5 µg / mL).
- Le pouvoir anti-radicalaire très proche à celle de la vitamine C.
- Une inhibition significative dose-dépendante du radical DPPH.

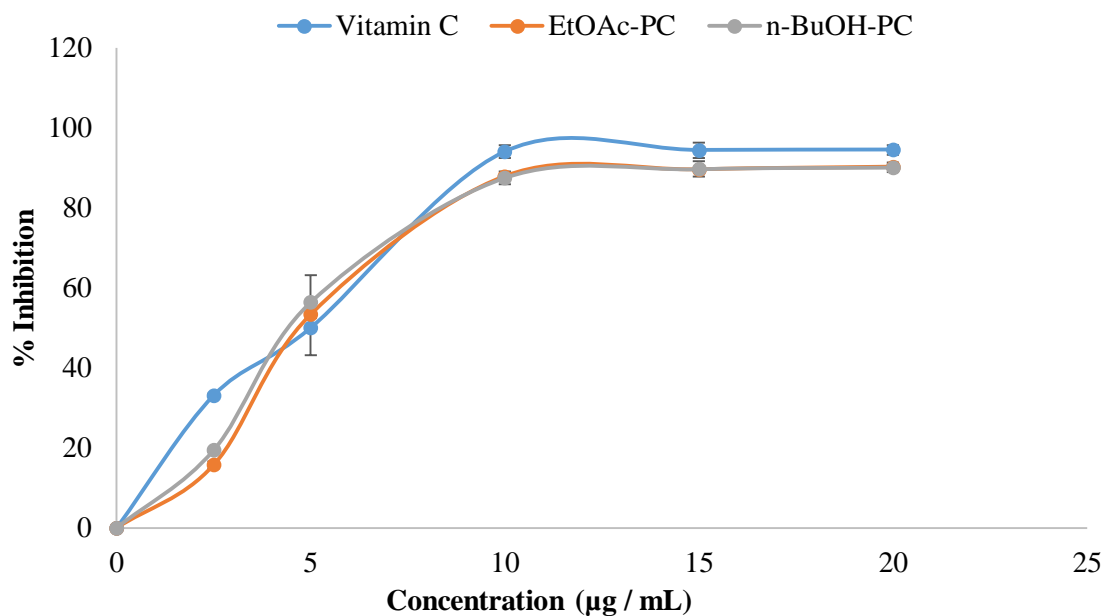


Figure 12 : Courbes représentant le % d'inhibition du DPPH' des extraits acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia* ainsi que de la vitamine C (standard antioxydant) en fonction de la concentration. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type ($n=3$).

La concentration d'un extrait ou d'un standard provoquant 50% d'inhibition du DPPH' (IC_{50}) est calculée graphiquement à partir de la courbe linéaire pour chaque extrait et sont illustrées dans la figure (13). Les deux extraits de la plante *P. coronopifolia* semblent avoir l'effet inhibiteur le plus puissant sur le radical DPPH' avec des concentrations inhibitrices médianes dans l'ordre de IC_{50} de vitamine C < IC_{50} de *n*-BuOH-PC = IC_{50} de EtOAc-PC avec des valeurs IC_{50} respectivement de : $05 \pm 0.10 \mu\text{g} / \text{mL}$; $07.01 \pm 0.02 \mu\text{g} / \text{mL}$ et $07.02 \pm 0.28 \mu\text{g} / \text{mL}$.

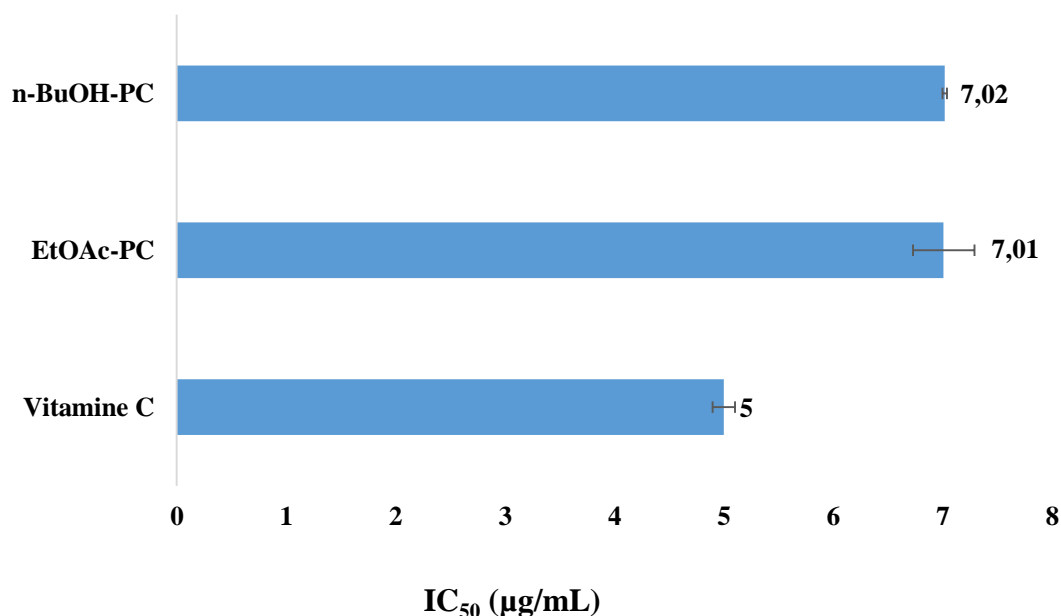


Figure 13: Valeurs d'IC₅₀ des extraits acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia* et de la vitamine C vis-à-vis le piégeage du radical DPPH'. Les valeurs sont des moyennes ± écart type (n= 3).

II.1.1.7. Piégeage du radical hydroxyle (OH[•])

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure (14) et représentent la variation du pourcentage d'inhibition. Ces derniers montrent que les différents extraits ont une activité antioxydante très élevée contre ce radical libre. À la dose 100 µg /mL, les extraits EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC présentent un pouvoir anti-radicalaire plus élevé respectivement de 70.9 % et 70.53 %. La vitamine C présente une Inhibition de 98 % avec une dose de 50 µg /mL dans les mêmes conditions.

Les extraits présentent un pouvoir significativement élevé de neutralisation des radicaux hydroxyles formés par la réaction de Fenton dans le milieu réactif et cet effet observé est dose-dépendant. Les concentrations inhibitrices médianes sont de 11.17 ± 0.01 ; 14.59 ± 0.11 et 24.77 ± 1.24 µg / mL d'échantillon pour la vitamine C, EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC, respectivement. Cette activité anti-radicalaire de différents extraits est très élevée comparant à celle obtenus avec la vitamine C dans les mêmes conditions (figure 15). Une inhibition dose-dépendante du radical hydroxyle (OH[•]) a été également déterminée avec tous les extraits.

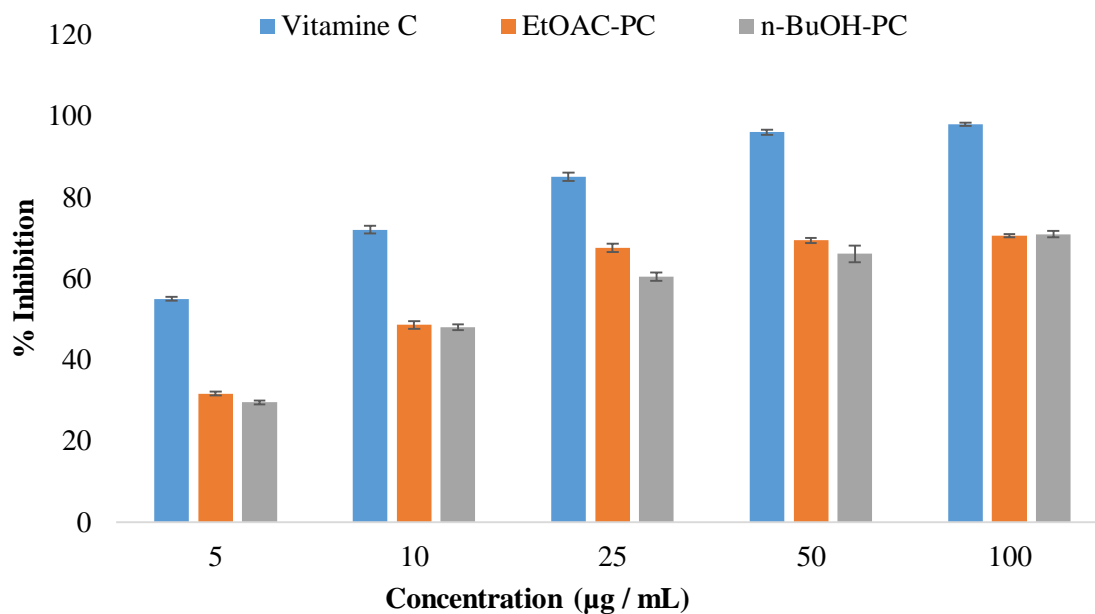


Figure 14 : Activité anti-radicalaire du radical hydroxyle (OH^{\cdot}) des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*- BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia* et de la vitamine C (standard antioxydant). Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 3).

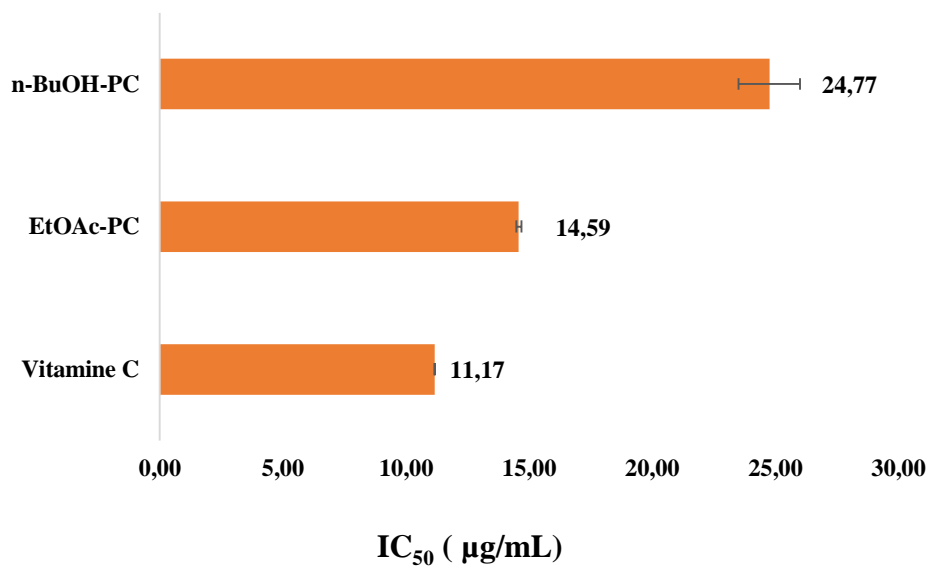


Figure 15 : Valeurs de l'IC₅₀ des extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia* et de la vitamine C vis-à-vis le piégeage de radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 3).

II.1.1.8. Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique

Le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique (non enzymatique) des extraits EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC est testé dans l'homogénat de vitellus d'œuf par le FeSO₄ est évalué par apport à la vitamine C (un standard antioxydant). Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure (16).

Ces résultats montrent que les deux extraits ont une capacité très importante d'inhiber la peroxydation lipidique. Dans les mêmes conditions et à la dose 200 µg / mL, cette capacité d'inhibition est de : 97.90 % ; 83.36 % et 82.37% pour la vitamine C, EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC, respectivement.

Ces résultats permettent aussi de calculer les concentrations inhibitrices médianes (IC₅₀) de chaque extrait et de la vitamine C. Les extraits EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC ont montré des IC₅₀ de 79.09 ± 5.61 et 95.62±1.74 µg/mL, respectivement figure (17).

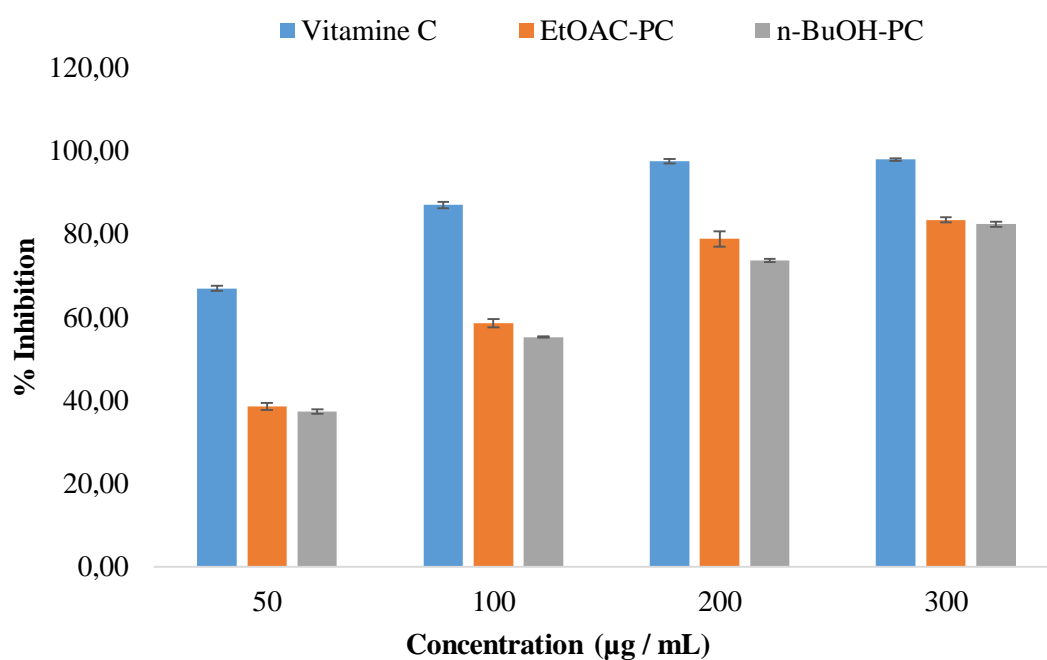


Figure 16: Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (formation du MDA) des extraits acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanolique (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia* ainsi que de la vitamine C (standard antioxydant). Les valeurs sont des moyennes ± écart type (n= 3).

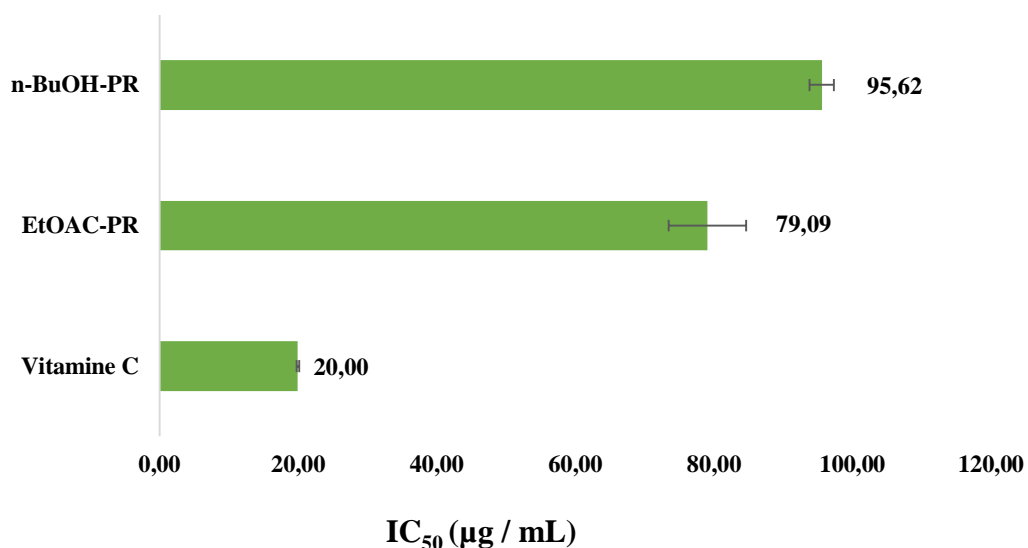


Figure 17: Valeurs de l'IC₅₀ des extraits acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia* et de la vitamine C vis-à-vis l'inhibition de la peroxydation lipidique. Les valeurs sont des moyennes ± écart type (n= 3).

II.1.2. Efficacité d'inhibition des dommages à l'ADN

Les résultats de ce test ont montré que les extraits EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC à la dose de 50 µg présentaient une protection complète de l'ADN plasmidique, en présentant une seule bande dans l'électrophorèse sur gel d'agarose, identique à celle obtenue avec l'échantillon de contrôle non irradié (C₀). La forme circulaire (C) de l'ADN non traité a été convertie en forme coupée: relaxée (R) et / ou linéaire (L), ce qui indique l'endommagement de l'ADN plasmidique. Alors que le post-traitement avec ces extraits a retrouvé l'ADN à sa forme circulaire native (figure 18).

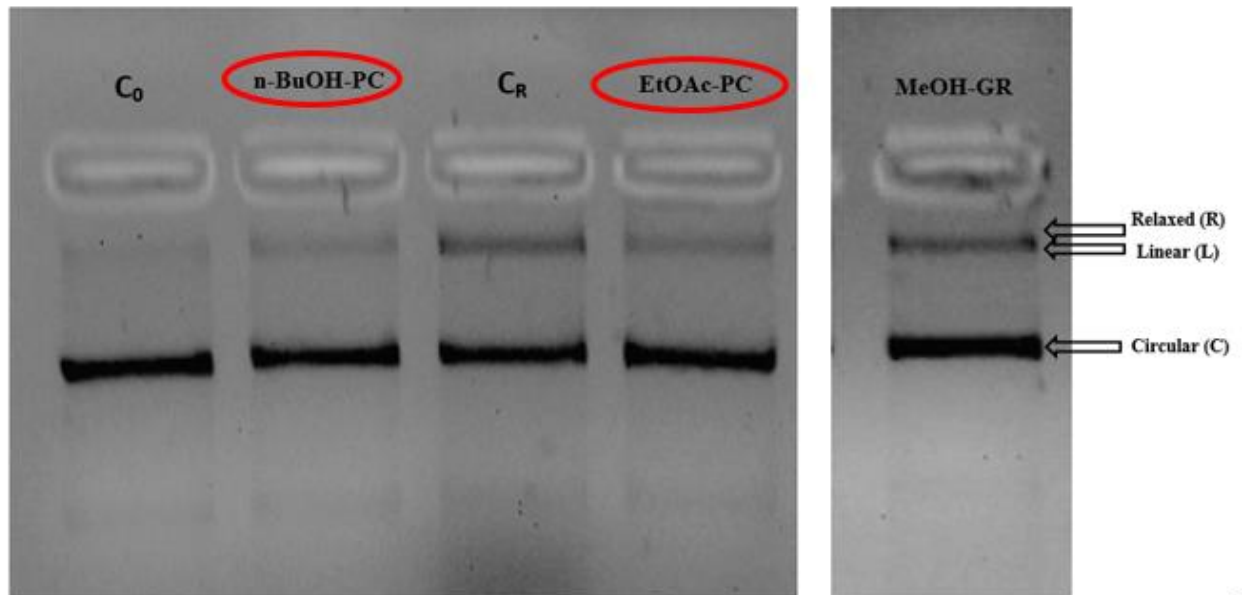


Figure 18: Effet des deux extraits acétate d'éthyle (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia* à la dose: 50 µg, contre les dommages oxydatifs de l'ADN plasmidique 46966 causés par la photolyse UV de H₂O₂ (3%, v / v). C₀ = ADN non irradié non traité. *n*-BuOH-PC = ADN irradié aux UV traité avec l'extrait *n*-BuOH-PC. EtOAc-PC = ADN irradié aux UV traité avec l'extrait EtOAc-PC. C_R = ADN non irradié aux UV.

II.1.3. Propriétés anticancéreuses

II.1.3.1. Activité antiproliférative (par le système xCELLigence)

Les résultats du test anticancéreux en utilisant les cellules cancéreuses HeLa sont illustrées dans les figures : 19, 20 et 21. Par contre les figures 22, 23 et 24 montrent les résultats du test anticancéreux en utilisant des cellules cancéreuses C6.

Au cours des deux premières heures, les cellules non traitées avec Les extraits ont été proliférées d'une façon normale, mais dans un milieu nutritif elles n'ont pas évolué. Ensuite, l'ajout des extraits EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC a montré qu'ils ont une activité antiproliférative très importante avec la concentration de 250 µg / mL contre les deux lignées de cellules cancéreuses et étaient sur le point d'atteindre le milieu après 50 h après le traitement, tandis qu'à d'autres concentrations (100 µg / mL et 50 µg / mL), ces extraits montrent une activité très faible, presque la même avec le contrôle pendant la même période.

Les profils représentant le traitement par ces extraits ont également montré des différences à divers moments. Des faibles concentrations ont montré certaines activités inhibitrices contre les

cellules HeLa à la 15^{ème} h (figures 19 et 20), et contre les cellules C6 à la 31^{ème} h (figures 22 et 23) après le post-traitement, mais après quelques heures, ces concentrations ont perdu leur capacité d'inhibition.

Chaque substance a été testée deux fois en triple contre des lignées cellulaires en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA. Comme on le voit sur le diagramme, plusieurs concentrations d'extrait ont été appliquées aux cellules et chaque couleur représente une concentration différente (—250 µg/mL, —100 µg/mL, —50 µg/mL, —Control, —Medium).

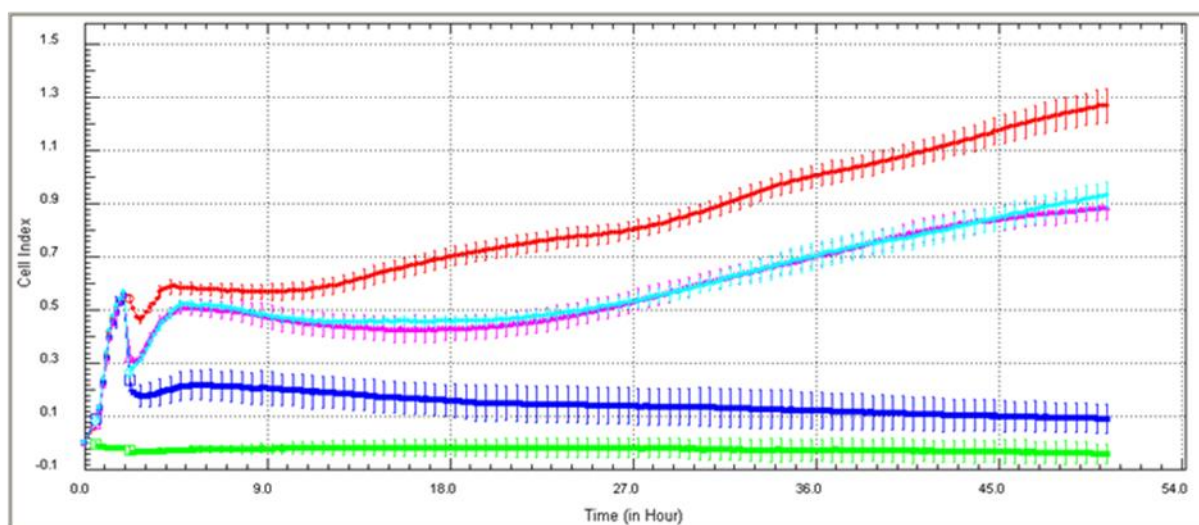


Figure 19 : Activité anticancéreuse de l'extrait acétate d'éthyle de *P. coronopifolia* (EtOAc-PC) contre la lignée cellulaire HeLa ($2,5 \times 10^4$ cellules / puits).

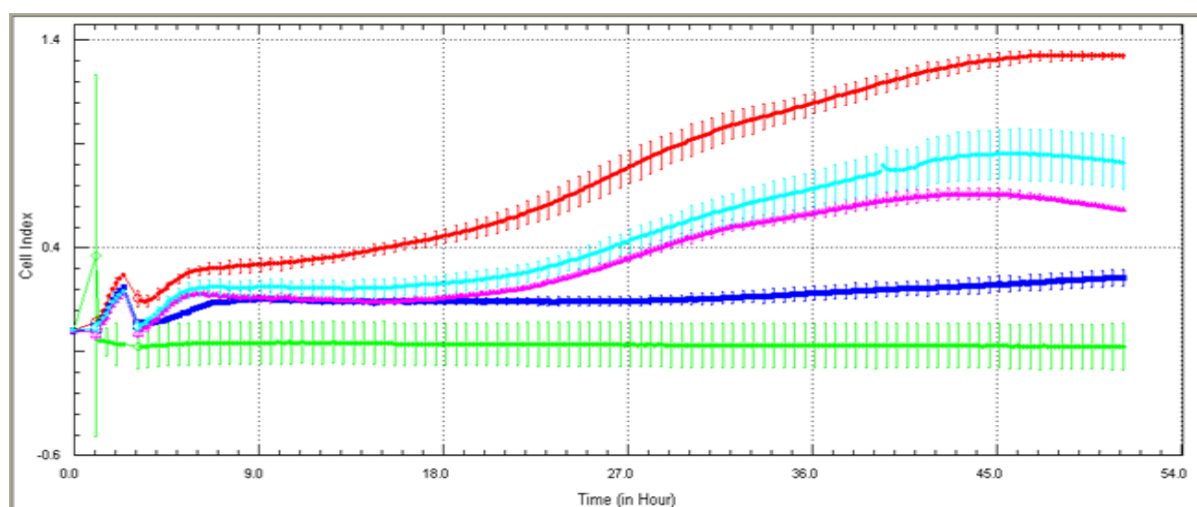


Figure 20: Activité anticancéreuse de l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* (*n*-BuOH-PC) contre la lignée cellulaire HeLa ($2,5 \times 10^4$ cellules / puits).

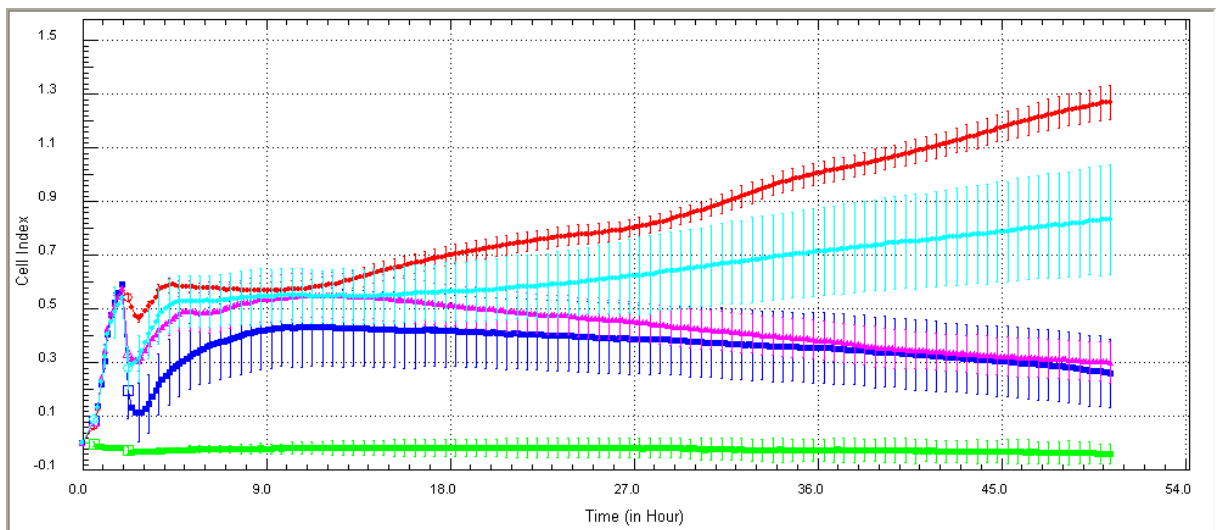


Figure 21 : Activité anticancéreuse de 5-florourasil comme témoin positif contre la lignée cellulaire HeLa ($2,5 \times 10^4$ cellules / puits).

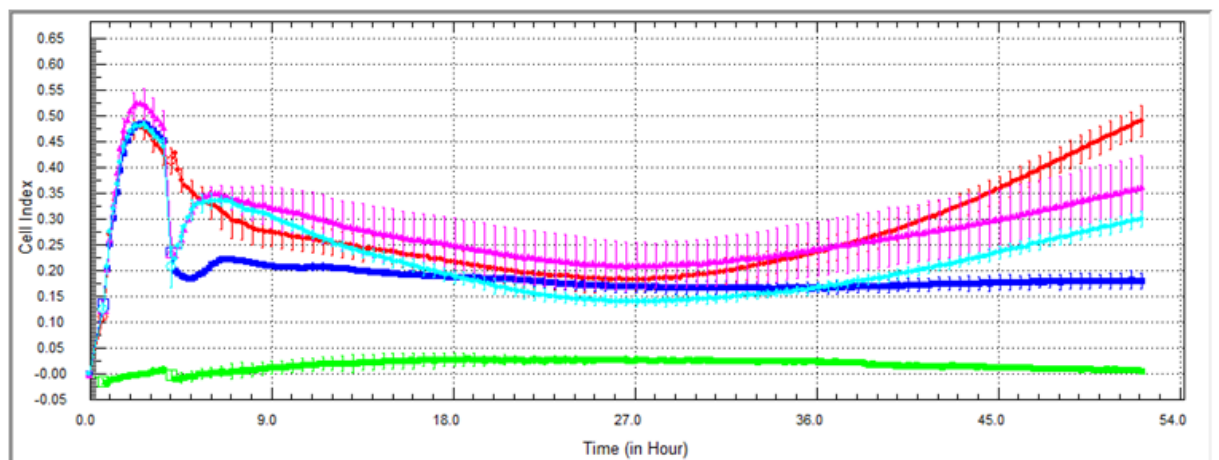


Figure 22 : Activité anticancéreuse de l'extrait acétate d'éthyle de *P. coronopifolia* (EtOAc-PC) contre la lignée cellulaire C6 ($2,5 \times 10^4$ cellules / puits).

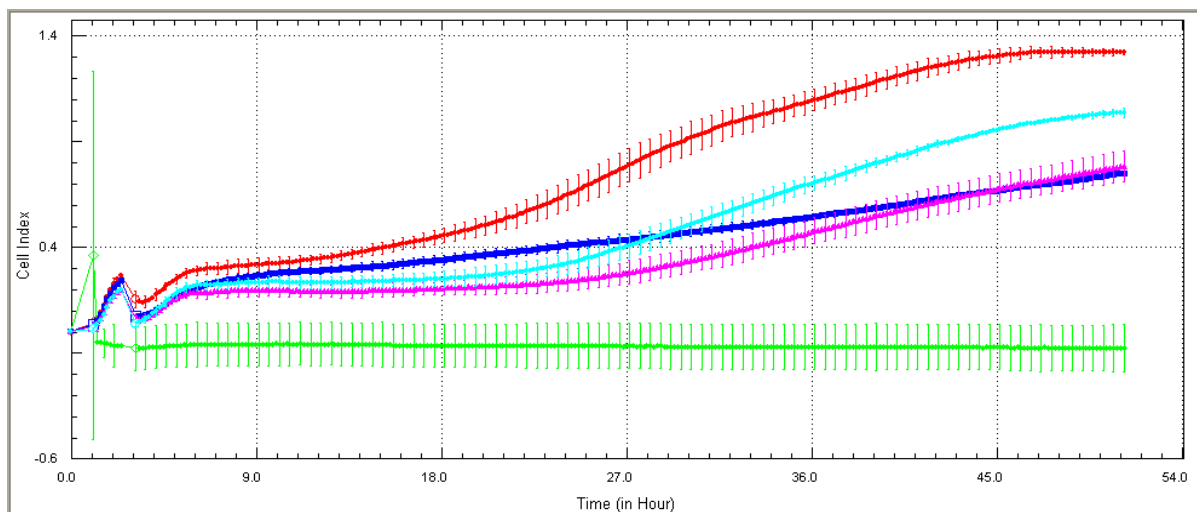


Figure 23 : Activité anticancéreuse de l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* (*n*-BuOH-PC) contre la lignée cellulaire C6 ($2,5 \times 10^4$ cellules / puits).

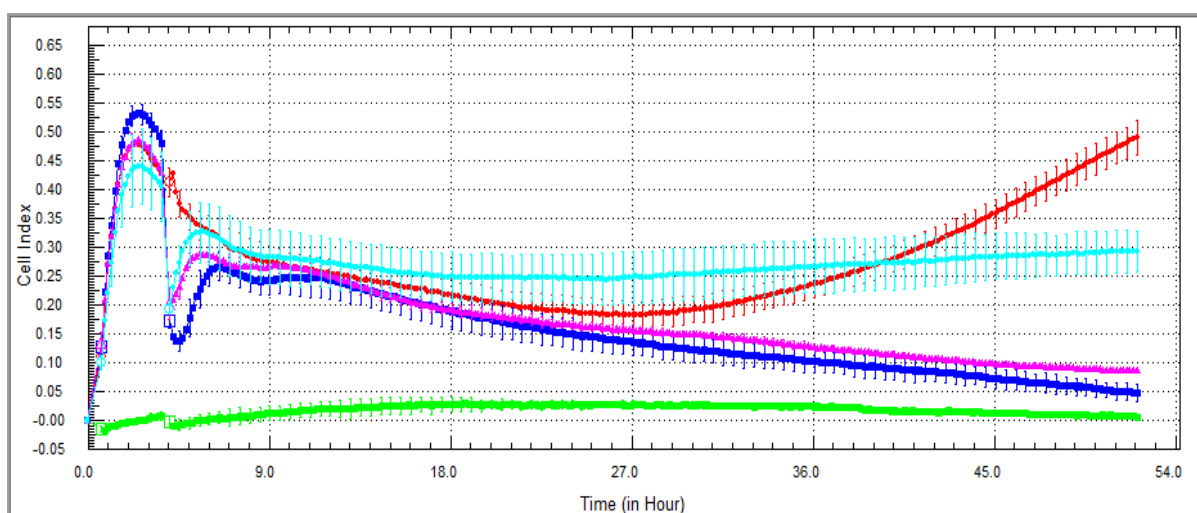


Figure 24 : Activité anticancéreuse de 5-fluorouracil comme témoin positif contre la lignée cellulaire C6 ($2,5 \times 10^4$ cellules / puits).

II.1.3.2.Prolifération cellulaire (par ELISA-BrdU Proliferation)

Les activités antiprolifératives des échantillons (lignées cellulaires C6 et HeLa) et du témoin positif ont été étudiées sur huit concentrations (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 et 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Les valeurs d'IC₅₀ et IC₇₅ des extraits et du 5-fluorouracile (5-FU) ont été identifiées en utilisant les programmes ED50 plus v1.0 (Tableau 07).

Les résultats obtenus indiquent que les concentrations les plus faibles de l'extrait d'EtOAc-PC (5 et 10 µg / mL) montrent une faible activité antiproliférative contre les cellules HeLa et que des concentrations plus élevées (50, 75 et 100 µg / mL) présentent une activité antiproliférative plus élevée en comparaison par le 5-FU (figure 25). La puissance d'inhibition à 100 µg / mL était: 5-FU > EtOAc-PC.

Cependant, on a observé que l'extrait EtOAc-PC avait l'activité antiproliférative supérieure à celle du 5-FU à 40-75 ug / ml contre les cellules C6 (figure 26). La puissance d'inhibition (à 75 µg / mL) était: extrait d'EtOAc-PC > 5-FU.

Plusieurs concentrations de chaque extrait ont été appliquées aux cellules (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 et 100 µg/mL). Chaque substance a été testée deux fois en triple contre des lignées cellulaires. Les données montrent une moyenne de deux expériences individuelles.

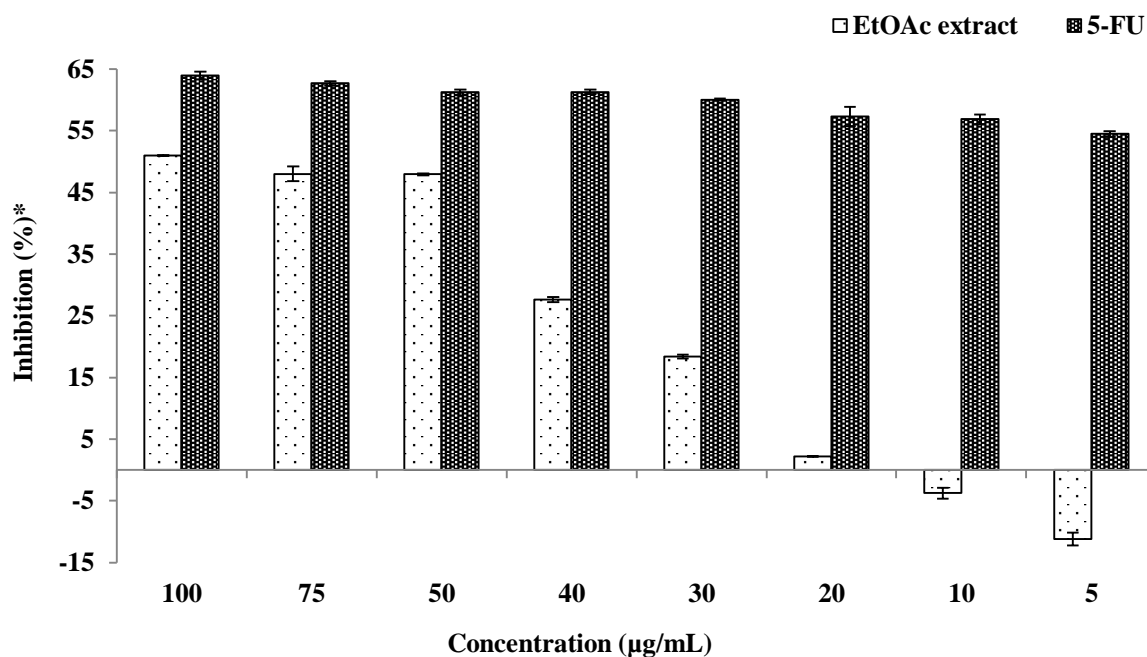


Figure 25 : Activité antiproliférative de l'extrait acétate d'éthyle de *P. coronopifolia* (EtOAc-PC) et de 5-FU contre la lignée cellulaire HeLa (3×10^4 cellules / puits).

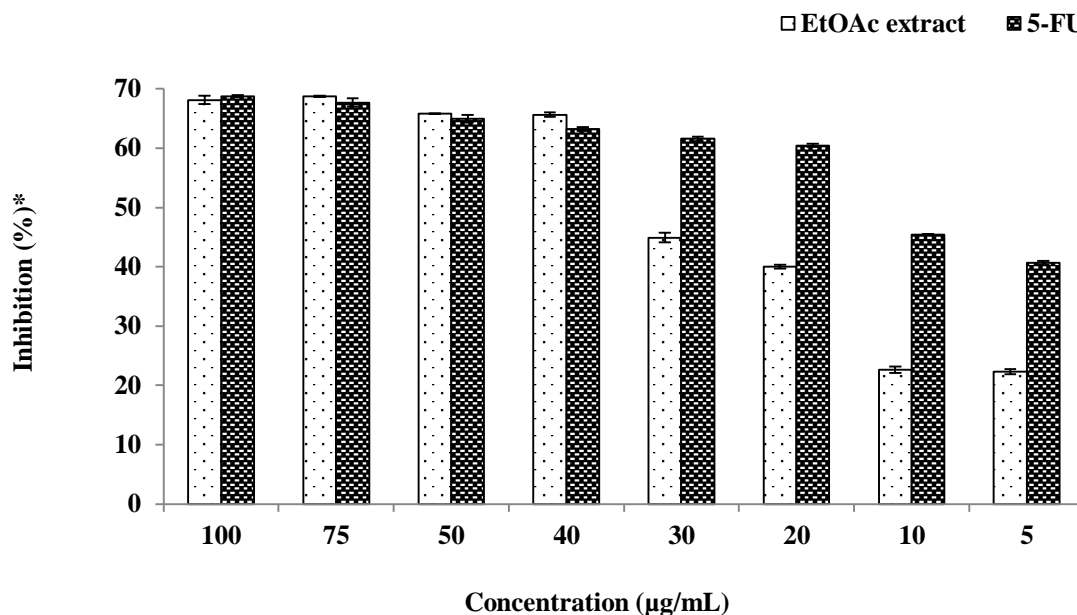


Figure 26 : Activité antiproliférative de l'extrait acétate d'éthyle de *P. coronopifolia* (EtOAc-PC) et de 5-FU contre la lignée cellulaire C6 (3×10^4 cellules / puits).

Les activités antiprolifératives par l'extrait EtOAc-PC et 5-FU sont exprimées en termes d'IC₅₀ et d'IC₇₅ et sont données dans le tableau (07). La comparaison des valeurs d'IC₅₀ contre les lignées cellulaires HeLa et C6 indique que ce sont les lignées C6 les plus actives. De même, les valeurs d'IC₇₅ de l'extrait EtOAc-PC montrent que cet extrait a une activité plus importante contre les lignées cellulaires C6 par rapport aux celles de HeLa.

Tableau 07 : Valeurs IC₅₀ et IC₇₅ de l'extrait acétate d'éthyle de *P. coronopifolia* (EtOAc-PC) et de 5-fluorouracile, présenté par dosage antiprolifératif contre les lignées cellulaires HeLa et C6 (3×10^3 cellules / mL).

Extrait de plante		Les cellules HeLa		Les cellules C6	
		IC50	IC75	IC50	IC75
<i>P. coronopifolia</i>	EtOAc	45.49	63.71	11.81	44.64
5-FU		**	**	**	12.03

*>>100 µg/mL. **<5 µg/mL.

II.1.3.3. Effect cytotoxique

L'effet cytotoxique des extraits a été déterminé par le test de fuite de la lactate déshydrogénase (LDH) contre la lignée cellulaire C6 et présenté en pourcentage de cytotoxicité (08). Ce test repose sur l'utilisation du kit de détection de la cytotoxicité LDH. L'extrait EtOAc-PC ne présente pas des effets cytotoxiques par rapport au 5-Flu.

Tableau 08 : Pourcentage de cytotoxicité des extraits d'acétate d'éthyle de la plante *P. coronopifolia* (EtOAc-PC) et le 5-FU présenté par le test de fuite du lactate déshydrogénase (LDH) contre la lignée cellulaire C6 (5 x 10³ cellules / mL).

Extrait	Cytotoxicity (%)
EtOAc-PC	0
5-FU	19

II.2. Tests *in vivo*

II.2.1. Effets sur le taux du MDA dans le foie, le rein et le cœur

Les résultats obtenus dans les figures (27, 28 et 29) montrent une variation significative ($p < 0,01$) détectée dans le taux du MDA (dans les différents homogénats) chez les rats traités avec du PCP. L'administration de l'extrait *n*-butanol de la plante *P. coronopifolia* (50 mg / kg) a normalisé les valeurs du niveau d'MDA en comparaison avec le groupe PCP. La vitamine E a fourni une protection significative vis-à-vis de la peroxydation lipidique induite par le PCP.

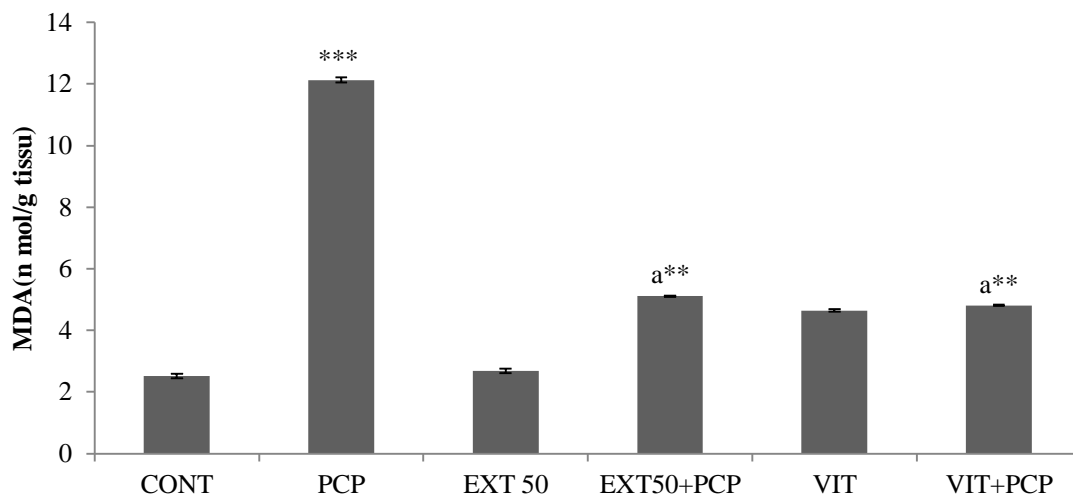


Figure 27: Effet du PCP, de l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique (MDA) dans les homogénats hépatiques. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

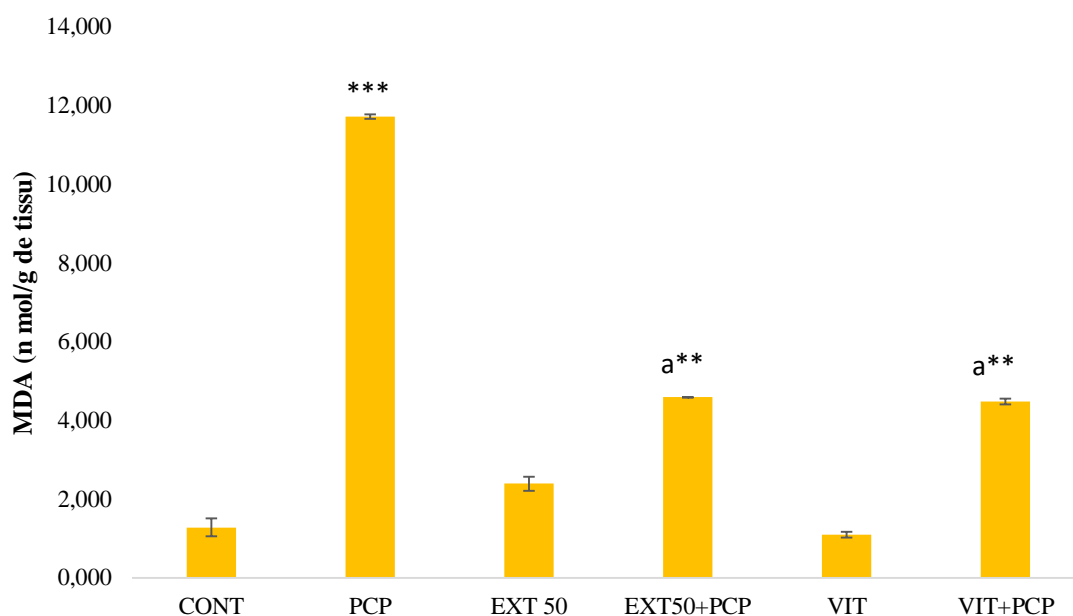


Figure 28: Effet du PCP, de l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique (MDA) dans les homogénats des reins. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; VIT E: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

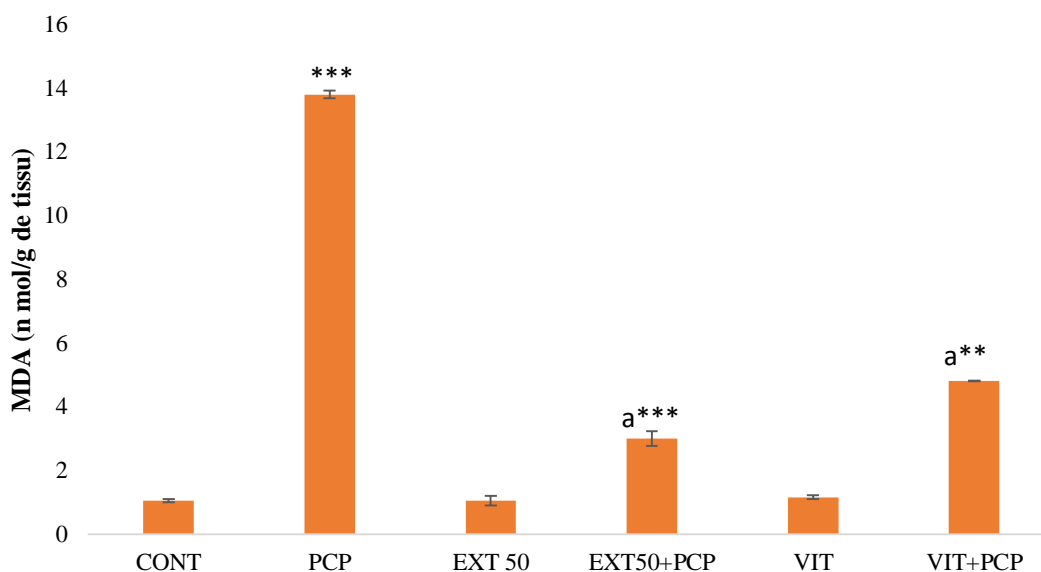


Figure 29: Effet du PCP, de l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique (MDA) dans l'homogénats des cœurs. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; VIT E: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

II.2.2. Effets sur le taux du glutathion dans le foie, le rein et le cœur

Un changement important dans le contenu du GSH a été induit par le traitement PCP par rapport au contrôle. Dans le Co-traitement avec l'extrait de plante et la vitamine E, la concentration du GSH a été considérablement augmentée dans le foie, le rein et le cœur par rapport aux groupes témoins. Les résultats sont illustrés dans les figures 30,31 et 32.

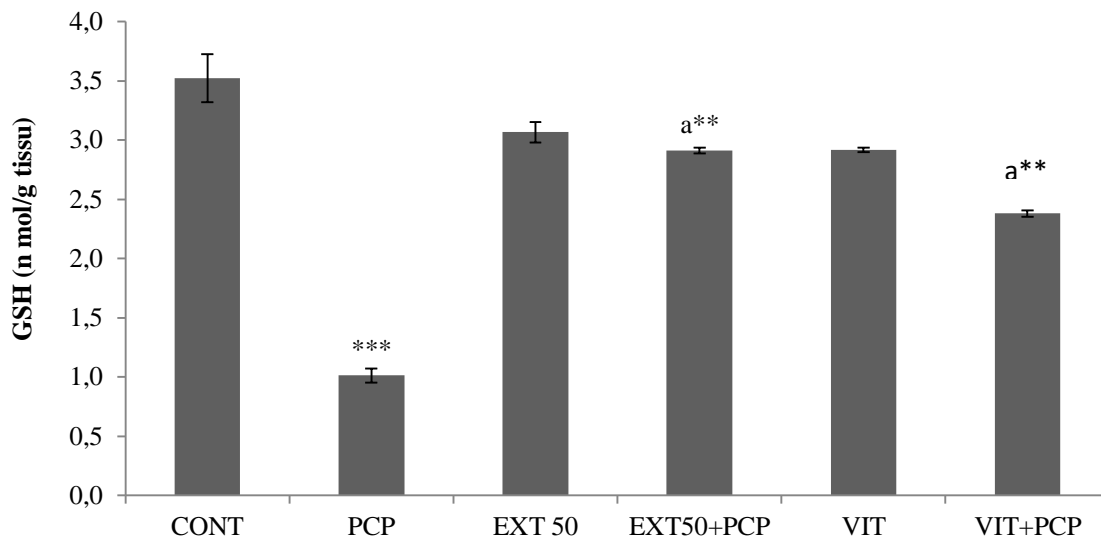


Figure 30: Effet de la PCP, de l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* et de la vitamine E sur les niveaux de GSH dans les homogénats hépatiques. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

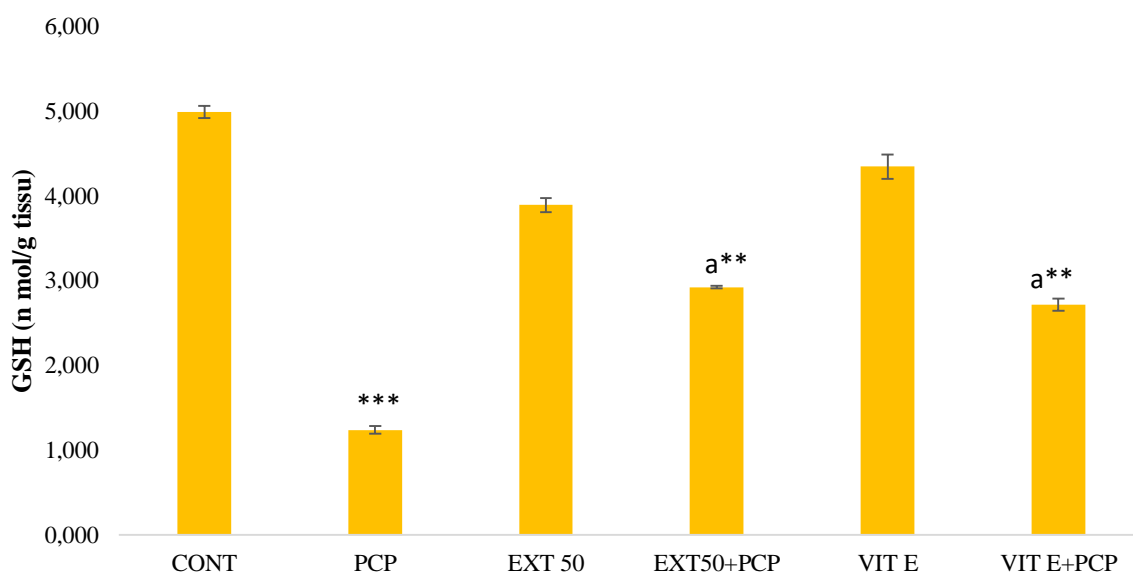


Figure 31: Effet de la PCP, de l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* et de la vitamine E sur les niveaux de GSH dans les homogénats des reins. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; VIT E: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

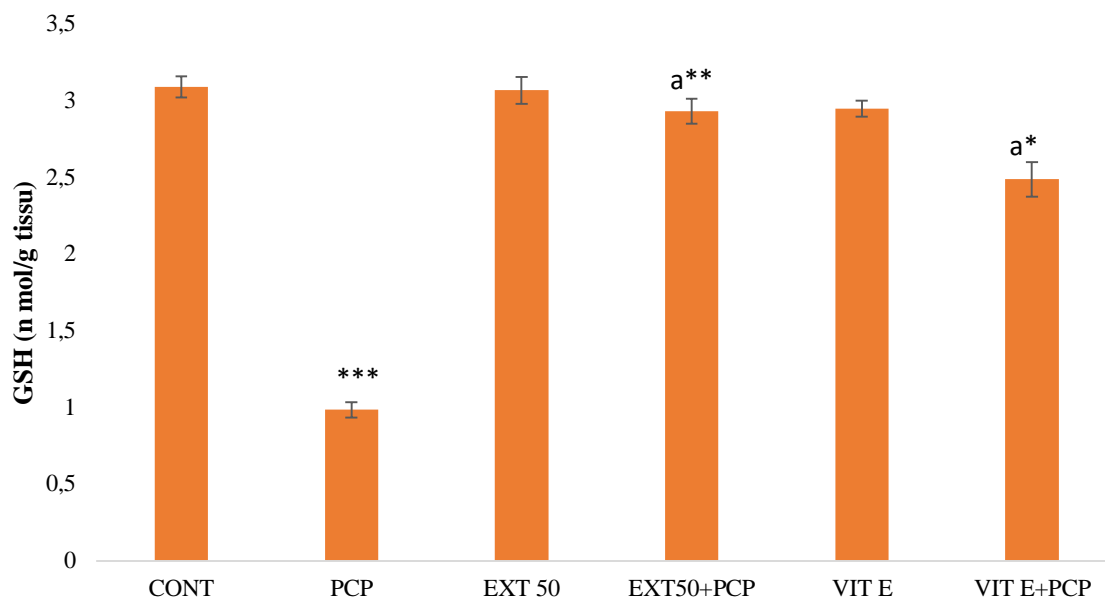


Figure 32: Effet du PCP, de l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* et de la vitamine E sur les niveaux de GSH dans les homogénats de cœurs. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; VIT E: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

II.2.3. Effet sur l'activité du GPx dans le foie, le rein et le cœur

Le PCP a provoqué une altération significative ($P < 0,001$) du GPx au niveau du foie, rein et cœur par rapport au groupe témoin. L'activité de la glutathion peroxydase était significativement diminuée ($p < 0,01$) dans les différents homogénats du groupe PCP. Par contre le co-traitement avec l'extrait de plante et la vitamine E a conduit à une augmentation de l'activité de l'enzyme. Après l'administration du de PCP avec l'extrait et/ou la vitamine E, l'activité du GPx était plus proche de celles des groupes témoin. Les résultats sont illustrés dans les figures 33, 34 et 35 ci-dessous.

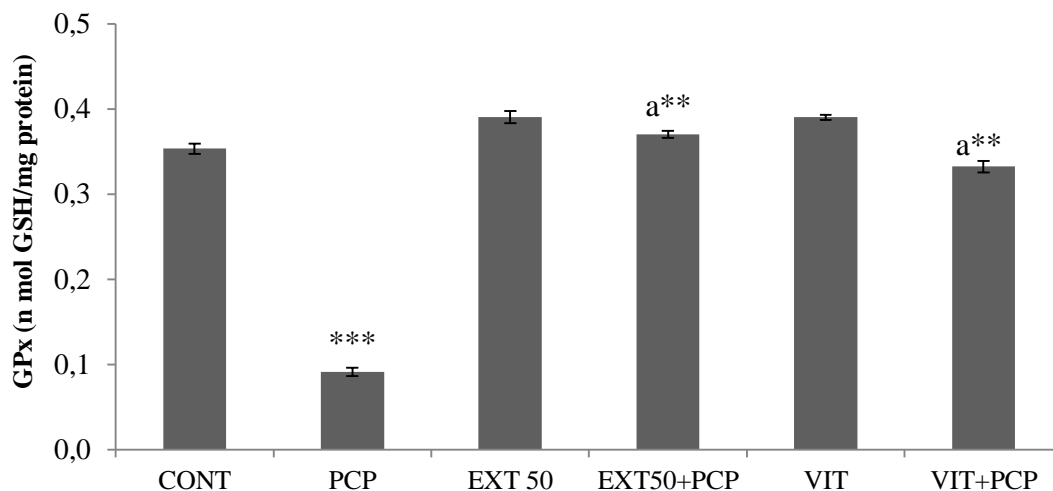


Figure 33: Effet du PCP, de l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* et de la vitamine E sur l'activité du GPx dans les homogénats hépatiques. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

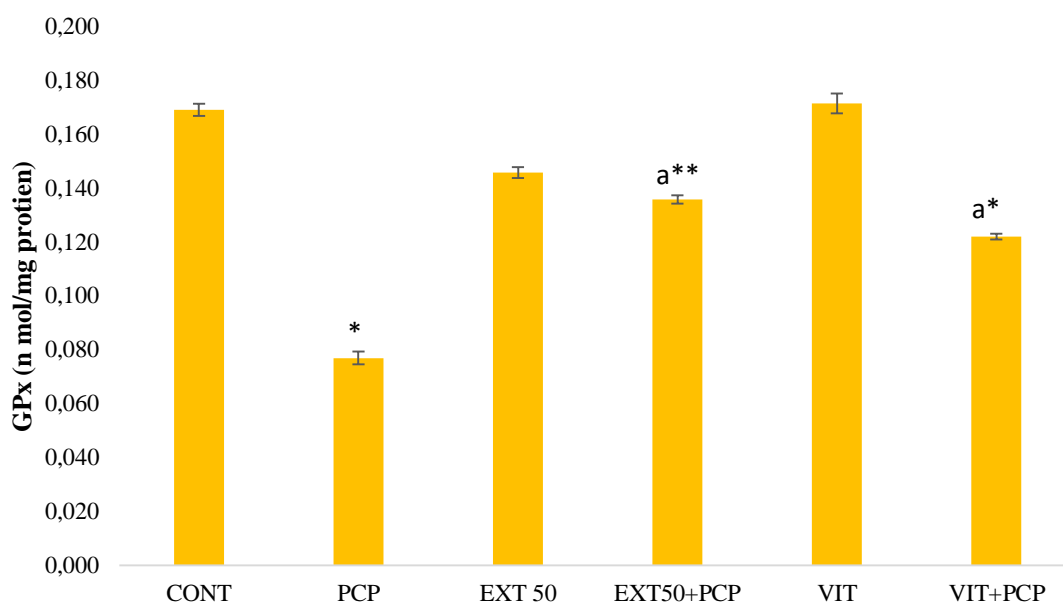


Figure 34: Effet du PCP, de l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* et de la vitamine E sur l'activité du GPx dans les homogénats de reins. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

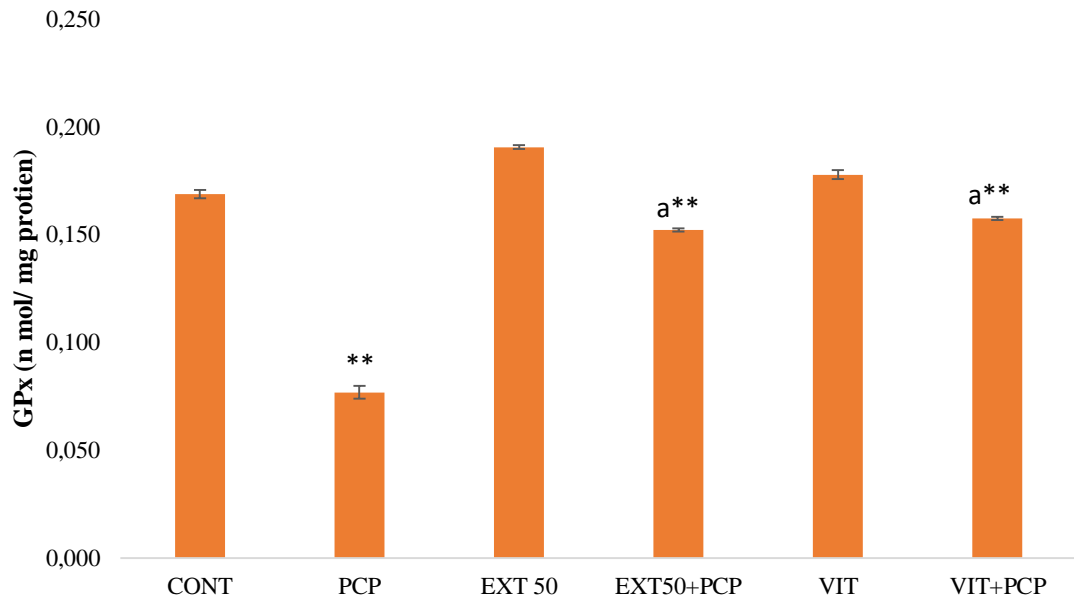


Figure 35: Effet du PCP, de l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* et de la vitamine E sur l'activité du GPx dans les homogénats de cœurs. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

II.2.4. Résultats de dosage des paramètres biochimiques

Une augmentation significative des AST (p <0,01) et ALT (p <0,05) a été enregistrée dans le groupe PCP; par rapport au groupe témoin (tableau 07). La pré-administration d'extrait de plante ou de vitamine E a abaissé significativement l'activité AST et ALT (p <0,01) par rapport au groupe PCP. Donc on remarque un maintien des niveaux sériques de transaminases sériques a été montré dans les groupes traités avec l'extrait de plante et dans les groupes de vitamine E.

Aussi bien les résultats montrent une augmentation significative (p <0,01) du taux sérique de cholestérol et de triglycérides dans le groupe PCP par rapport au groupe témoin (tableau 09). Tandis que dans le Co-traitement avec l'extrait de plante ou la vitamine E, les niveaux de cholestérol et de triglycéride provoquaient une diminution significative de ces deux paramètres.

L'altération de la fonction rénales a été remarquée chez les animaux traités par le PCP qu'ont montré une augmentation significative (p <0,05) du niveau sérique de la créatinine par rapport au groupe des animaux témoins. Alor que le prétraitement par la vitamine E ou par l'extrait de la plante a montré une diminution significative (p <0,05) du taux de la créatinine par apport au groupe traité par le PCP.

Tableau 09: Effet du PCP, de l'extrait *n*-butanol de la plante *P. coronopifolia* et de la vitamine E sur les paramètres biochimiques (sériques) chez les rattes. AST : glutamates oxaloacétate transaminases, ALT : glutamate pyruvate transaminases, CHO : cholestérol, TRI : triglycérides, URE : urée, BIL-T : bilirubines totaux, CREA : créatinines. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg. Vit: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes ± écart type (n= 6). *p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

	CONT	PCP	EXT 50	EXT50+PCP	VIT	VIT+PCP
ALT (U/L)	36,2±3,736	48,66±1,366 *	36,4±2,797	37,75±0,463 a*	37,5±5,043	37,8±1,814 a*
AST (U/L)	58±2,507	100,25±3,151 **	57,666±2,60	58,25±0,88 a**	57,5±3	58,5±2,31 a**
CHO (mg/dL)	36±1,88	54,66±2,75 **	36±0,756	7,5±0,886 a*	36,25±2,435	37,75±3,955 a*
TRI (mg/dL)	121,25±2,96	146,75±2,765 *	119±3,464	122,2±3,853 a*	120,4±3,921	121,2±2,044 a*
CREA (mg/L)	10,016±0,349	14,66±1,146 *	10,2±1,848	11,45±1,443 a*	8,9±1,066	9,875±0,509 a*
BIL (mg/L)	6,73±1,221	10,33±1,167 **	8,25±1,443	8,8±1,155 a*	5,1±0,393	6,4±2,811 a**

II.2.5. Evaluation de poids corporels des animaux

La figure (36) illustre le pourcentage d'évolutions de poids des animaux pendant les deux semaines de traitement. Les résultats montrent une augmentation normale du poids corporel chez les animaux traités par l'extrait et la vitamine E par rapport au groupe témoins.

Alors que chez les rats traités par le PCP, le pourcentage d'évolutions de poids des animaux est stabilisé (6%) à partir du 7^{ème} jour de traitement. On a remarqué une différence significative (p <0,01) du pourcentage d'évolutions de poids des animaux recevant le PCP par rapport au celui des animaux non traité. Le poids corporel est progressivement normalisée lors du prétraitement avec l'extrait et avec la vitamine E en présentant une augmentation significativement importante (p <0,01) par rapport au celui des rats recevant le PCP.

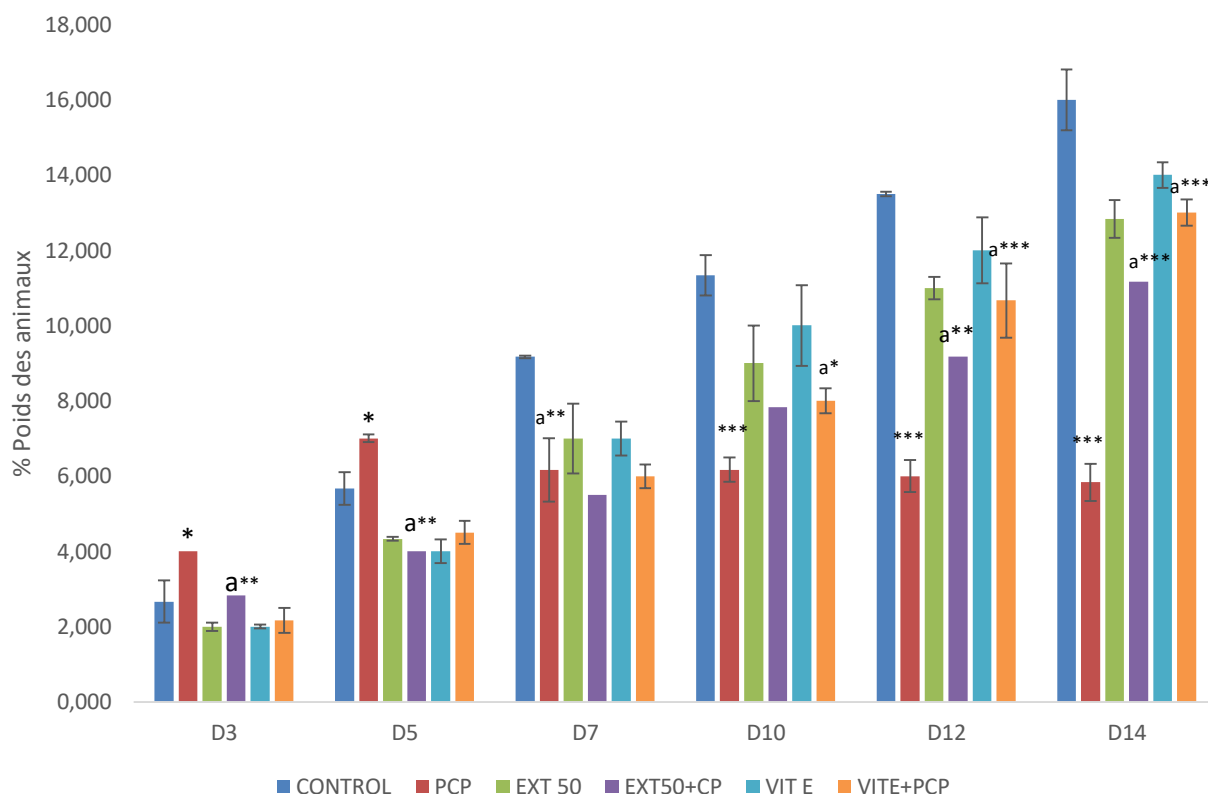


Figure 36: Effet du PCP, de l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* et de la vitamine E sur le poids des rats. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

III. Conclusion

Les composés phénoliques ont des effets bénéfiques attribués à leurs propriétés antioxydantes. Cette étude a été conçue pour évaluer *in vitro* la teneur totale en composés phénoliques et en flavonoïdes, le pouvoir antioxydant, protection oxydative de l'ADN et activité anticancéreuse de l'extrait d'acétate d'éthyle et de *n*-butanol de *P. coronopifolia*, plante endémique. Les résultats expérimentaux ont montré que les deux extraits de cette plante avaient un taux approprié de polyphénols et de flavonoïdes. En outre, ils ont fourni un fort pouvoir antioxydant et réducteur, une forte puissance de piégeage d'ERO et d'inhibition de la peroxydation lipidique. Comme ils sont des inhibiteurs de dommage oxydatif de l'ADN plasmidique, des anticancéreux à des concentrations plus élevées contre certaines cellules cancéreuses. Les données obtenues sur ces deux extraits de *P. coronopifolia* pourraient être utiles dans la protection humaine contre les infections et les maladies dégénératives.

Les produits naturels issus des plantes constituent toujours une partie nécessaire des systèmes thérapeutiques dans les pays en développement. Le PCP est un composé organochloré bien connu principalement utilisé comme herbicide général, pesticide et agent de préservation du bois, ainsi qu'un insecticide et un biocide à large spectre.

Dans la présente étude, les propriétés antioxydantes *in vivo* de l'extrait *n*-butanol de la plante *P. coronopifolia* ont été étudiées en termes de son effet hépato-protecteur, néphroprotecteur et cardio-protecteur vis-à-vis d'une toxicité induite par le PCP. Des rats femelles Wistar Albinos ont été utilisés dans cette étude; Le PCP (20 mg / kg) et l'extrait *n*-butanol de la plante (50 mg / kg) ont été administrés quotidiennement par gavage pendant deux semaines.

L'étude expérimental *in vivo* a montré une augmentation significative des taux du LPO dans les organes analysés (foie, rein et cœur) des animaux traités avec ce pesticide alors qu'ils sont diminués dans le groupe témoin et celui traité par l'extrait de plante. En outre, le PCP a provoqué des diminutions significatives des activités de l'enzyme GPx et des niveaux de GSH, et cette diminution a été réduite dans les groupes traités avec l'extrait de plante. Aussi bien, l'hépatotoxicité, la néphro-toxicité et la cardio-toxicité induites par le PCP sont caractérisaient par augmentation de l'activité des enzymes sériques et les niveaux de bilirubines totaux, des triglycérides, de cholestérol et de la créatinine. Par contre ces enzymes et ces paramètres ont été restaurés chez les animaux traités avec l'extrait *n*-butanol de la plante.

La diminution significative des niveaux de GSH et de l'activité enzymatique du GPx et l'augmentation des taux sériques d'enzymes, d'autres paramètres biochimiques et de LPO ont révélé les propriétés antioxydantes de cet extrait. L'extrait de plante a un potentiel antioxydant élevé, et a complètement atténué l'effet toxique du PCP dans le foie, le rein, le cœur et le sérum. Le prétraitement par cet extrait et la vitamine E a diminué les altérations fonctionnelles et les lésions structurelles de ces organes.

En conclusion, les extraits de la plante *P.coronopifolia* possèdent des effets antioxydants puissant puisqu'ils contiennent une teneur très importante en substance bioactives. Cette dernière agit comme des antiprolifératifs contre certaines lignes cellulaires de cancer, un puissant protecteur de l'ADN plasmidique et un protecteur des différents organes (foie, rein et cœur) sur le plan structurel et fonctionnel.



2- Etude expérimentale de la plante:

Gaillonia reboudiana Coss.

Etude expérimentale de la plante: *Gaillonia reboudiana* Coss.

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

Nom de la plante: *Gaillonia reboudiana* Coss.

I.1.1. Classification systématique de la plante.

Tableau 10 : Classification systématique de la plante *Gaillonia reboudiana* Coss.

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophytes
Sous Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Rubiales
Famille	Rubiaceae
Genre	<i>Gaillonia</i>
Espèce	<i>Reboudiana</i>

I.1.2. Nom traditionnel

Espèce dite : السدرة البيضاء, Sedra elbeyda, Djilfna, Fessyet es-sib, Sedret es-sib, Tibskit n-tmgart.

I.1.3. Distribution

Espèce endémique présente au Sahara septentrional et au Sahara occidental.

I.1.4. Description

Arbuste bas, l'écorce du tronc et des branches âgées est grise, les rameaux sont souvent opposés. Quand cette plante est déflourie elle rappelle les chenopodiacées. Les feuilles opposées sont charnues, allongées et étroites, plus large à leur extrémité et terminées par une pointe. Les fleurs sont situées au bout des rameaux, elles ont une corolle tubuleuse à quatre lobes cachée par

de nombreuses bractées ciliées qui donne un aspect plumeux à l'ensemble. Les fleurs épanouies sont blanches, en bouton elles sont teintées de brun ou de pourpre ainsi que les bractées. La taille est de 20 à 40 cm.

I.1.5. Récolte

Le matériel végétal a été récolté en mai 2011, à 70 km de la ville Béchar sur la route menant à Béni Abbes, sud-ouest de l'Algérie. Il a été authentifié par M. Mohamed Benabdelhakem, directeur de l'agence de la préservation de la nature, de Béchar. Un spécimen (GR0511-BEC-ALG-53) a été déposé au niveau de l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri Constantine 1.

I.1.6. Extraction

Elle est réalisée par le *Dr Boussaha Sara* au Laboratoire d'Unité de Recherche et Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives, Analyses Physico-Chimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Frères Mentouri Constantine 1, Algérie.

Le matériel végétal séché à l'air et à l'abri des rayons solaires et de l'humidité, d'un poids total de 980 g (150 g feuilles, 190 g fleurs et 640 g tiges) de l'espèce *G. reboudiana* Coss. et Dur. est pulvérisé. Les trois types d'organes sont mis à macérer séparément dans l'éther de pétrole une fois pendant 24 h. Les mélanges sont ensuite filtrés et concentrés à sec, donnant ainsi 4,3 g d'extrait éther de pétrole (fleurs : 2 g, feuilles : 0,5 g et tiges : 1,8 g). Les marcs sont ensuite extraits par le chloroforme 3 fois pendant 48 h. Après filtration et évaporation du solvant, 26,47 g d'extrait chloroforme ont été obtenus (fleurs : 10,93 g, feuilles : 6,91 g et tiges 8,63 g). Les marcs récupérés sont de nouveau mis à macérer dans le méthanol 3 fois pendant 48 h. Après filtration et évaporation totale du solvant, 42,16 g d'extrait méthanol total (fleurs : 22,99 g, 9,4 g feuilles, 9,77 g tiges) sont obtenus. Les rendements des différents extraits par rapport au matériel végétal sec sont donnés dans le tableau suivant.

Tableau 11: Rendement des différents extraits des parties aériennes de *G.reboudiana*.

Matériel Végétal (980g)	Extrait éther de pétrole total	Extrait chloroforme total	Extrait méthanol total
Poids (g)	4,3	26,47	42,16
Rendement (%)	0,44	2,70	4,30

I.2. Animaux

Des rattes femelles adultes de la souche Wistar Albinos (n= 48, de 7 à 8 semaines) pesant 213 ± 18 g ont été utilisés dans cette étude. Les rats ont été obtenus de l'animalerie de la faculté des sciences de la nature, Université Frères Mentouri, Constantine 1, Algérie. Les rattes sont placées aléatoirement en groupe de 6 dans des cages standards pour une période d'acclimatation (2 semaines) avant d'être utilisés dans des différentes expériences.

I.3. Les tests *in vitro*

L'étude *in vitro* est effectuée sur l'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR). Les propriétés antioxydantes, l'efficacité de l'inhibition des dommages de l'ADN et la culture cellulaire ont été réalisées comme décrit dans la première étude: Étude expérimentale de la plante: *Perralderia coronopifolia* Coss. (Page 40– 46).

I.4. Les tests *in vivo*

Les tests *in vivo* sont effectués en utilisant l'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR), et le pentachlorophénole (PCP) comme xénobiotique induisant la toxicité et la vitamine E (standard antioxydant) comme témoin positif.

La préparation des homogénats tissulaires, l'évaluation de la teneur en malondialdéhyde (MDA), de la teneur en glutathion (GSH), de l'activité de GPx ainsi que l'analyse statistique ont été effectuées comme décrit dans la première étude: Étude expérimentale de la plante (1): *Perralderia coronopifolia* Coss. (Page 46 - 48) au Département de biologie animale, Faculté de la nature et des sciences, Université Frères Mentouri Constantine 1, Algérie.

I.4.1. Traitement des animaux

Le PCP (20 mg / kg de poids corporel) et/ou l'extrait de la plante à deux doses (50 et 100 mg / kg de poids corporel) ont été administrés quotidiennement par gavage pendant deux semaines. La vitamine E est utilisé comme control positif avec une dose de 100 mg/ kg de poids corporel par gavage. Les rattes sont divisées en huit groupes chaque groupe contient 6 rattes :

- Le groupe I (Cont) a été servi comme contrôle négatif.
- Le groupe II (PCP) a reçu 20 mg de PCP / kg, pendant deux semaines.
- Le groupe III (EXT100) a reçu l'extrait de plante à 100 mg / kg pendant deux semaines.
- Le groupe IV (EXT100 + PCP) a reçu l'extrait de plante à 100 mg / kg et le PCP à 20 mg / kg pendant deux semaines.

- Le groupe V (EXT50) a reçu l'extrait de plante à 50 mg / kg pendant deux semaines.
- Le groupe VI (EXT50 + PCP) a reçu l'extrait de plante à 50 mg / kg et le PCP à 20 mg / kg pendant deux semaines.
- Groupe VII (VITE) a reçu la vitamine E à 100 mg / kg, ce groupe a été désigné comme groupe témoin positif pendant deux semaines.
- Groupe VIII (VITE + PCP) a reçu la vitamine E à 100 mg / kg et le PCP à 20 mg / kg. pour deux semaines.

Les animaux ont été pesés tous les matins durant les deux semaines de traitement. Les résultats enregistrés ont permis d'évaluer progressivement la variation des poids corporels des rats.

Les paramètres biochimiques de l'étude expérimentale de *G. reboudiana* (AST et ALT, cholestérol, triglycérides, bilirubines totaux, urée et créatinine) ont été effectués à l'aide des kits obtenus au niveau du laboratoire d'analyses biologique de l'Hôpital Militaire Universitaire d'Ali Mendjli, Constantine, Algérie.

II. Résultats et discussion

II.1. Tests *in vitro*

II.1.1. Propriétés antioxydantes

II.1.1.1. Contenu des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Les résultats de dosage des polyphénols dans l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) révèlent que cet extrait contient une quantité élevée de composés phénoliques, présentée en μg d'équivalent acide gallique (GAE) par mg de matière végétale. L'extrait MeOH-GR contient de $363.67 \pm 5.96 \mu\text{g GAE} / \text{mg d'extrait}$, (Figure 37).

D'autre part, l'évaluation quantitative des flavonoïdes a montré que cet extrait contient aussi une quantité très importante des flavonoïdes, présentée en μg d'équivalents de quercétine (QE) par mg de matériel végétal ($249 \pm 2.68 \mu\text{g QE} / \text{mg d'extrait}$) (Figure 37).

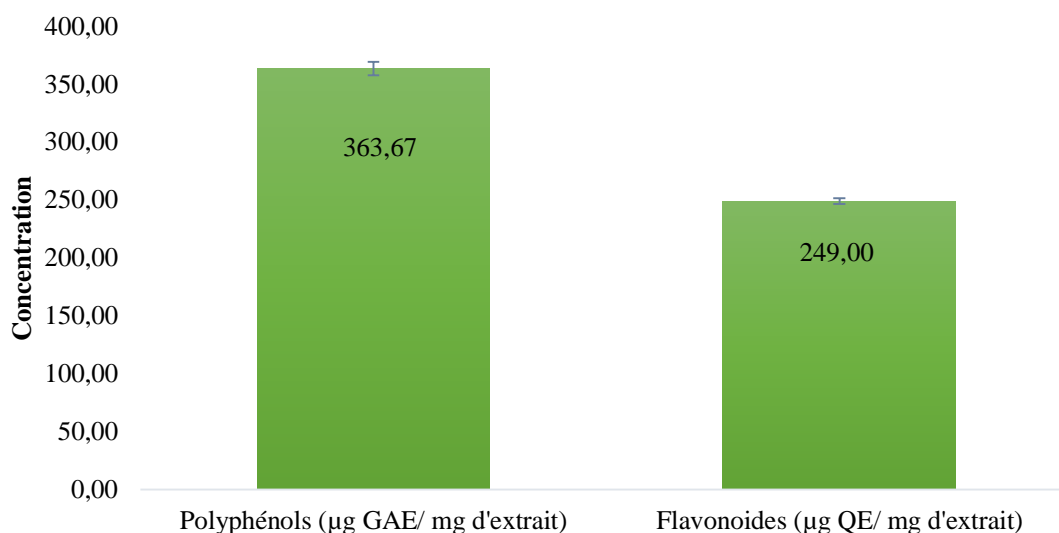


Figure 37 : Teneur totale de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) en polyphénols et flavonoïdes. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 3).

II.1.1.2. Activité antioxydante totale

L'extrait MeOH-GR de la plante *G. reboudiana* a montré une activité antioxydante totale mais inférieure à ceux des standards antioxydants.

Tableau 12a : Activité antioxydante totale de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR). Les valeurs sont des moyennes \pm écart type. (n= 6). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 par rapport aux standards antioxydants (vitamine C et BHA).

Echantillon	Activité antioxydante			
	3 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Activité antioxydante totale, 695 nm				
MeOH-GR	0.07 \pm 0.01	0.1 \pm 0.07**	0.46 \pm 0.02	0.95 \pm 0.02**
Vitamine C	0.042 \pm 0.020	0.294 \pm 0.013	0.999 \pm 0.065	2.699 \pm 0.019
BHA	0.074 \pm 0.009	0.193 \pm 0.021	0.683 \pm 0.024	1.511 \pm 0.056

II.1.1.3. Puissance réductrice

L'extrait MeOH-GR de la plante *G. reboudiana* a un pouvoir réducteur hautement significative (p<0.001) en comparaison à ceux des standards antioxydants : trolox, BHA et vitamine C (tableau 12b).

Tableau 12b: Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR). Les valeurs sont des moyennes \pm écart type. (n= 6). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 par rapport aux standards antioxydants (vitamine C, BHA et Trolox).

Echantillon	Activité antioxydante			
	3 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Puissance réductrice, 700 nm				
MeOH-GR	0.07 \pm 0.01***	0.12**	0.28**	0.49 \pm 0.01***
Vitamine C	0.545 \pm 0.005	1.129 \pm 0.030	3.496 \pm 0.211	3.817 \pm 0.049
BHA	0.336 \pm 0.014	0.587 \pm 0.015	1.158 \pm 0.129	3.496 \pm 0.047
Trolox	0.192 \pm 0.009	0.373 \pm 0.010	0.914 \pm 0.048	1.880 \pm 0.096

II.1.1 4. Activité de piégeage de H₂O₂

Les résultats illustrés dans le tableau (12c) ont montrés que l'extrait MeOH-GR de la plante *G. reboudiana* a une activité de piégeage de H₂O₂ plus proche à celle de trolox.

Tableau 12c: Piégeage du peroxyde d'hydrogène de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR). Les valeurs sont des moyennes \pm écart type. (n= 6). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 par rapport aux standards antioxydants (vitamine. C, vitamine E, BHA et Trolox).

Echantillon	Activité antioxydante			
	3 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Activité de piégeage de H₂O₂, %				
MeOH-GR	26.98 \pm 3.87	34.92 \pm 2.46	47.62 \pm 4.26	49.21 \pm 2.46
Vitamine C	17.46 \pm 0.75	34.09 \pm 2.08	53.96 \pm 0.94	66.66 \pm 0.57
Vitamine E	30.15 \pm 0.94	38.09 \pm 0.96	47.61 \pm 3.64	55.56 \pm 0.82
BHA	25.39 \pm 3.23	41.26 \pm 3.85	50.79 \pm 4.07	60.31 \pm 3.82
Trolox	31.70 \pm 2.05	41.25 \pm 0.77	46.03 \pm 2.67	50.79 \pm 0.62

II.1.1.5. Activité chélatante des métaux

L'extrait MeOH-GR de cette plante a une activité chélatante des métaux supérieure à celle de la vitamine E à la dose 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ et à 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$. De plus, elle est supérieure à celle de la vitamine C à la concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tableau 12d).

Tableau 12d: Activité de chélation des métaux de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR). Les valeurs sont des moyennes \pm écart type. (n= 6). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 par rapport aux standards antioxydants : EDTA, Vit. C, Vit. E et BHA.

Echantillon	Activité antioxydante			
	3 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Activité de chélation de métaux, %				
MeOH-GR	4.24 \pm 0.51	19.97 \pm 0.19*	29.96 \pm 0.88	35.58 \pm 0.66**
EDTA	10.24 \pm 1.34	21.85 \pm 0.67	37.45 \pm 3.04	45.94 \pm 1.21
Vitamine C	6.49 \pm 2.71	10.61 \pm 0.51	23.22 \pm 1.16	40.57 \pm 0.77
Vitamine E	6.24 \pm 1.27	8.86 \pm 1.84	20.22 \pm 2.07	23.60 \pm 3.16
BHA	2.12 \pm 0.39	21.10 \pm 0.70	36.83 \pm 3.67	52.56 \pm 1.84

II.1.1.6. Activité de piégeage de DPPH'

La mesure de capacité de piégeage de DPPH' a été réalisée dans l'extrait MeOH-GR en utilisant la vitamine C (acide ascorbique) en tant que piègeur de radicaux. Les résultats obtenus par ce test permettent de tracer le graphe de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour les différents extraits (figures 38 et 39).

Cette méthode a montré que cet extrait est un antioxydant avec une diminution dose-dépendante du radical DPPH'. L'extrait MeOH-GR de la plante *G. reboudiana* a :

- ✓ Un pourcentage d'inhibition du radical DPPH' plus élevé (91%) observé avec une dose de 150 $\mu\text{g / mL}$ de l'extrait.
- ✓ 50% des radicaux DPPH' ont été piégés avec une dose de 40 $\mu\text{g / mL}$ de l'extrait.
- ✓ Une inhibition significative dose-dépendante du radical DPPH' a été également observée.

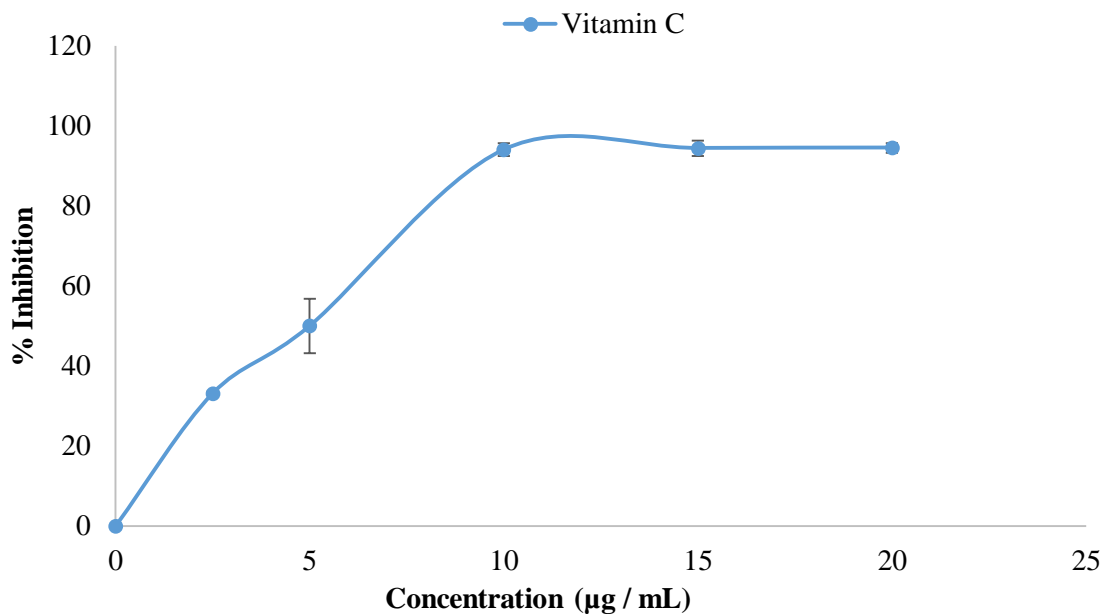


Figure 38: Courbe représentant le % d'inhibition du DPPH[•] de la vitamine C (standard antioxydant) en fonction de la concentration.

Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 3).

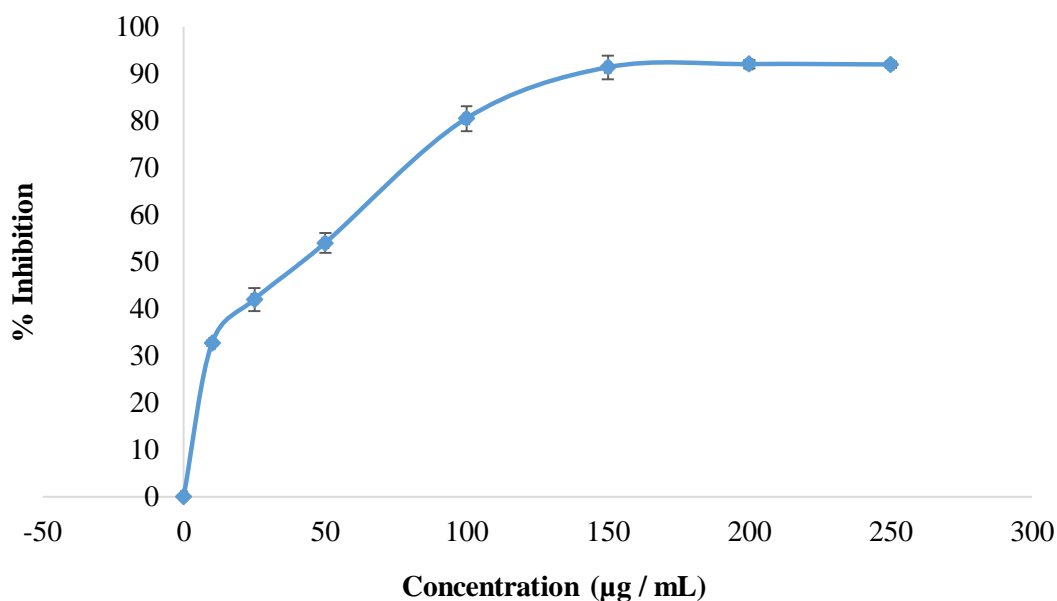


Figure 39: Courbe représentant le % d'inhibition du DPPH[•] par l'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et la vitamine C (standard antioxydant) en fonction de la concentration. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 3).

La concentration d'extrait et de standard provoquant 50% d'inhibition du DPPH \cdot (IC_{50}) est calculée graphiquement à partir de la droite de régression d'extrait (figure 40). L'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) a réagi positivement au test anti-radicalaire avec le DPPH \cdot . Il a présenté une valeur d' IC_{50} de $43.1 \pm 1.77 \mu\text{g} / \text{mL}$.

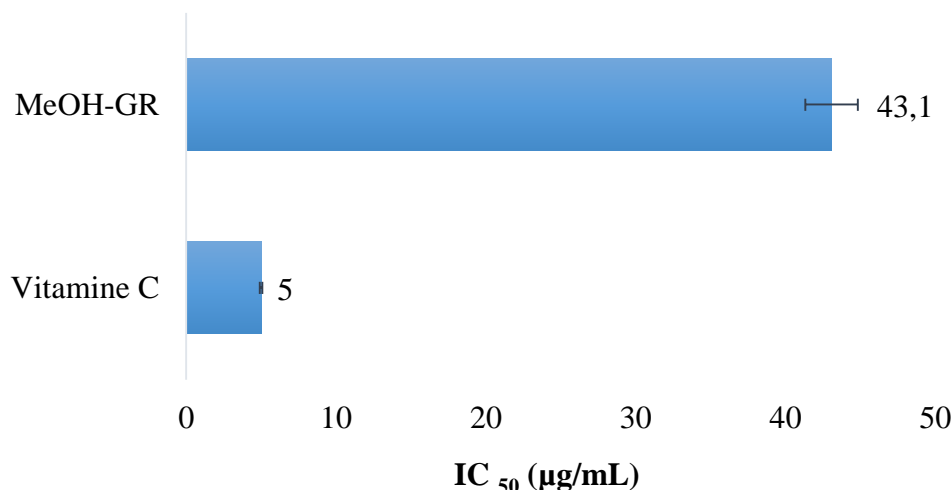


Figure 40: Valeurs d' IC_{50} de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine C vis-à-vis le piégeage de radical DPPH \cdot . Les valeurs sont des moyennes \pm écart type ($n= 3$).

II.1.1.7. Piégeage du radical hydroxyle (OH \cdot)

La capacité de l'extrait MeOH-GR à piéger le radical hydroxyle (OH \cdot) est également évaluée. À la dose $100 \mu\text{g} / \text{mL}$, il présente un pouvoir anti-radicalaire de 60.18 %. Alors que la vitamine C présente une inhibition de 98 % avec une dose de $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ dans les mêmes conditions (figure 41).

Ce qui explique la neutralisation des radicaux hydroxyles formés par la réaction de Fenton dans le milieu réactif. La concentration inhibitrice médiane de 11.17 ± 0.01 et $38.09 \pm 1.18 \mu\text{g} / \text{mL}$ d'échantillon pour la vitamine C et le MeOH-GR, respectivement. Cette activité anti-radicalaire est moins puissante que celle obtenue avec la vitamine C dans les mêmes conditions (figure 42). Une inhibition dose-dépendante du radical hydroxyle (OH \cdot) a été également déterminée.

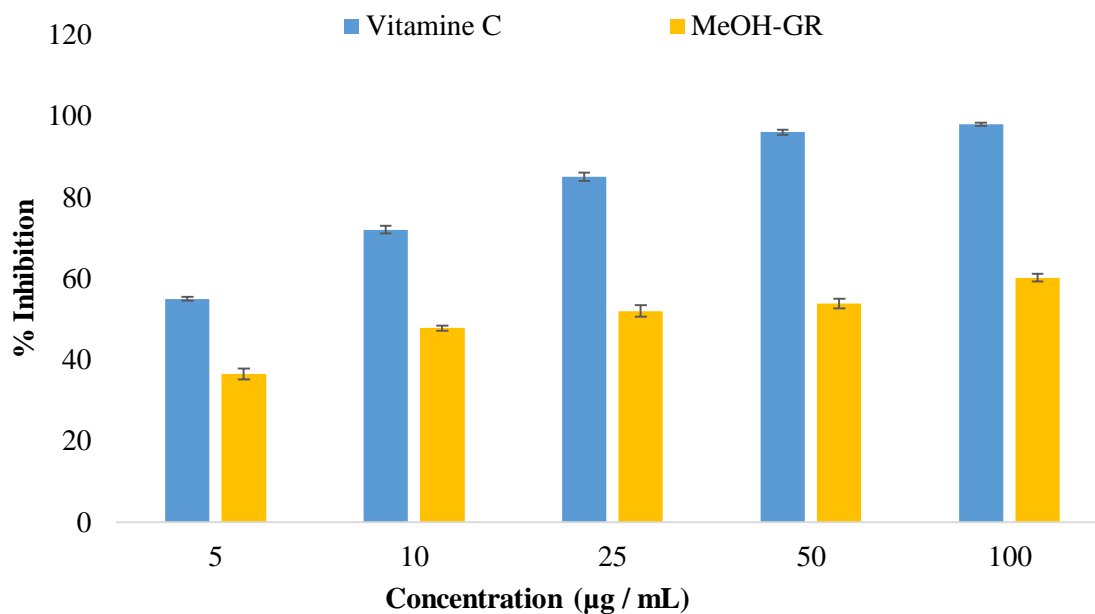


Figure 41 : Activité anti-radicalaire de radical hydroxyle (OH[•]) d'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine C (standard antioxydant). Les valeurs sont des moyennes ± écart type (n= 3).

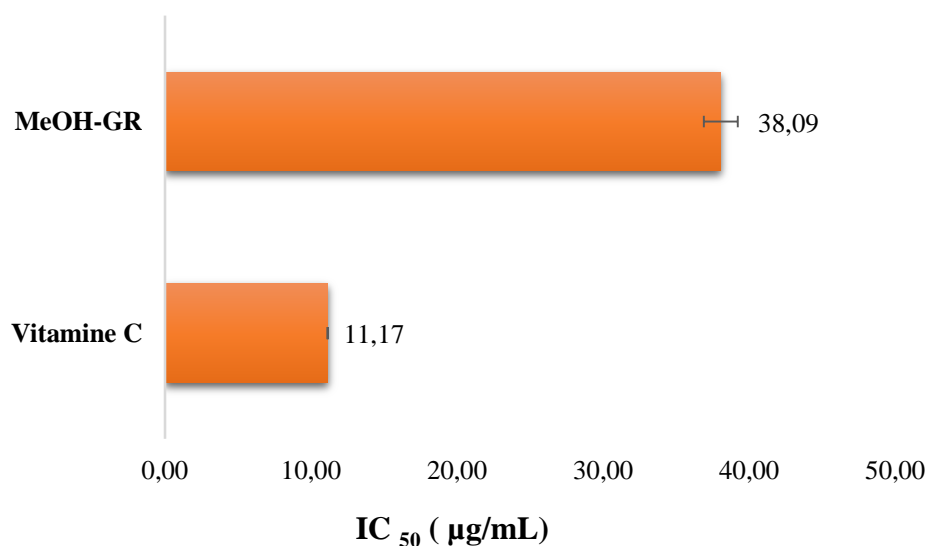


Figure 42 : Valeurs de l'IC₅₀ d'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine C vis-à-vis le piégeage de radical hydroxyle(OH[•]). Les valeurs sont des moyennes ± écart type (n= 3).

II.1.1.8. Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique

Le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique (non enzymatique) d'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) est testé dans l'homogénat de vitellus d'œuf par le FeSO_4 est évalué par rapport à la vitamine C (un standard antioxydant). Les résultats obtenus sont illustré dans la figure (43).

Ces résultats montrent que cet extrait a une capacité significative d'inhiber la peroxydation lipidique par rapport au contrôle positif. Dans les mêmes conditions et à la dose 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$, cette capacité d'inhibition est de : 97.90 % et 66.41% pour la vitamine C et le MeOH-GR, respectivement.

Ces résultats permettent aussi de tirer la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) de l'extrait en comparant avec celle de la vitamine C. les IC_{50} sont illustrées dans la figure (44).

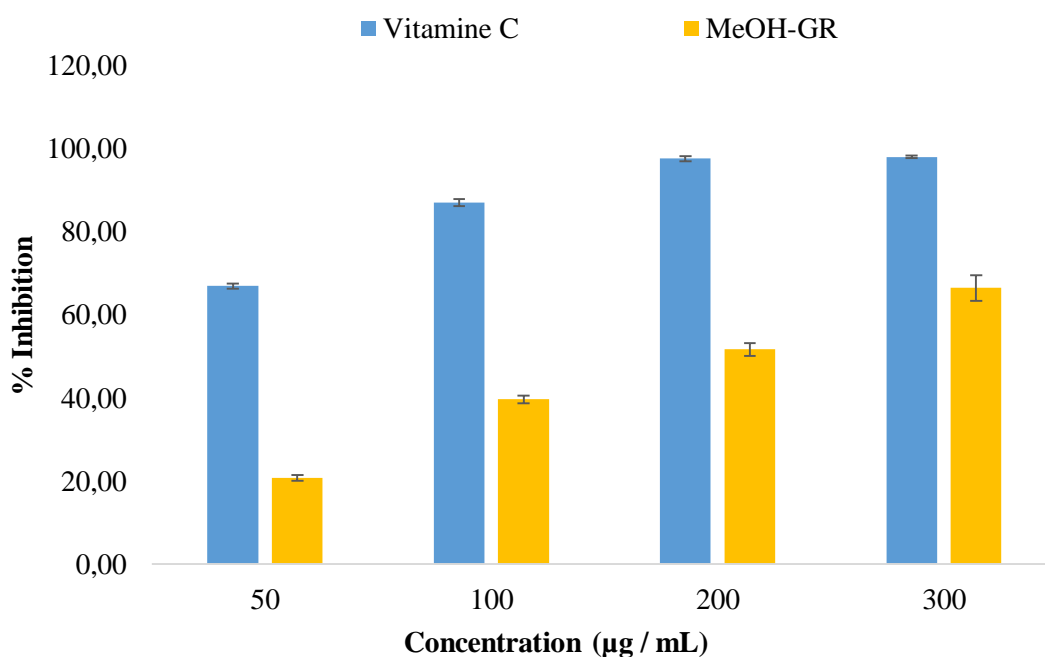


Figure 43: Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (formation du MDA) d'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) ainsi que de la vitamine C (standard antioxydant). Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 3).

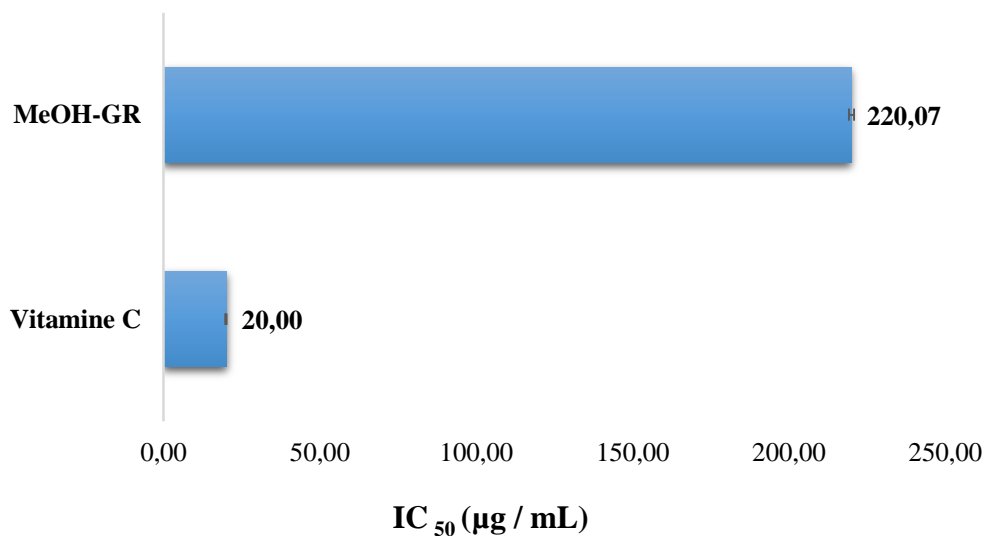


Figure 44: Valeurs de l'IC₅₀ d'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine C vis-à-vis l'inhibition de la peroxydation lipidique. Les valeurs sont des moyennes ± écart type (n= 3).

II.1.2. Efficacité d'inhibition des dommages à l'ADN

Les résultats de ce test ont montrés qu'avec une dose de 50 µg, le MeOH-GR n'a pas pu protéger la plupart de la quantité de l'ADN plasmidique dans l'échantillon contre les dommages oxydatifs. Deux bandes sont obtenues dans l'électrophorèse sur gel d'agarose, une dense dans le même niveau de la bande obtenue avec le contrôle non irradié (C₀) (ADN circulaire super-enroulé) et l'autre légère dans le même niveau de la bande obtenue avec le contrôle irradié non traité (C_R) (d'ADN plasmidique endommagé) (figure 45).

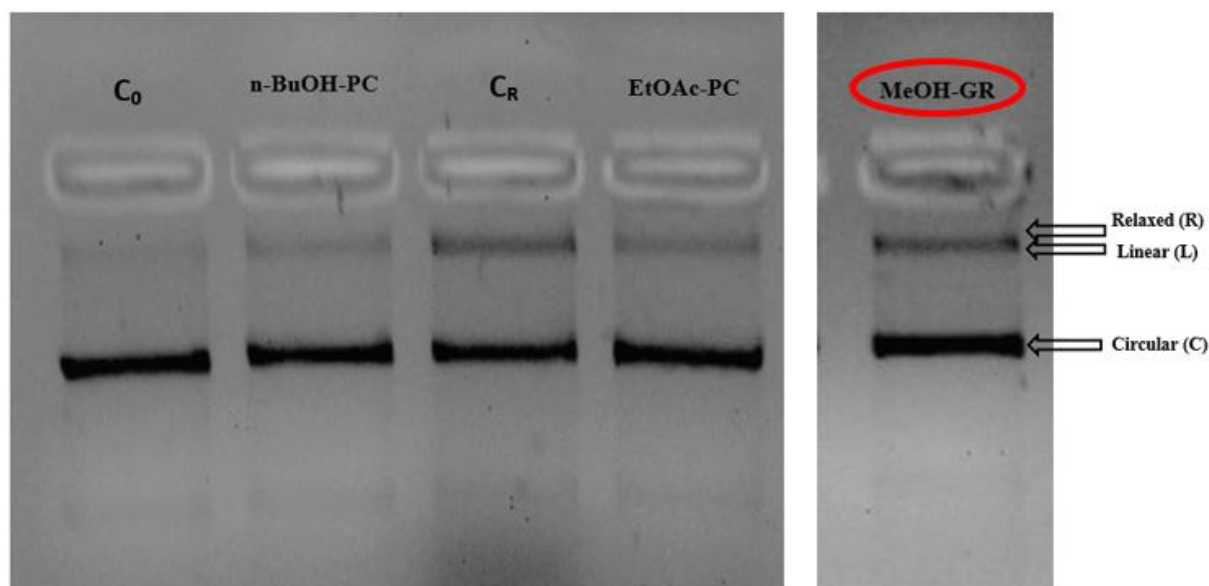


Figure 45: Effet de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) (50 µg) contre les dommages oxydatifs de l'ADN plasmidique 46966 causés par la photolyse UV de H₂O₂ (3%, v / v). C₀ = ADN non irradié non traité. MeOH-GR = ADN irradié aux UV traité avec l'extrait MeOH-GR. C_R = ADN non irradié aux UV.

II.1.3. Propriétés anticancéreuses

II.1.3.1. Activité anticancéreuse

Les résultats du test anticancéreux contre les cellules cancéreuses HeLa sont présentés dans les figures : 46 et 47 avec des barres de déviation de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et le 5-Fluorouracile (5-FU), respectivement. En outre, les figures 48 et 49 montrent les résultats du test anticancéreux contre des cellules cancéreuses C6, avec des barres de déviation de: MeOH-GR et 5-FU, respectivement.

Au cours des deux premières heures, les cellules non traitées avec l'extrait ont montré une croissance normale. Ensuite, l'extrait a été ajouté dans le milieu de culture cellulaire de chaque puits d'E-plaque 96.

Chaque substance a été testée deux fois en triple contre des lignées cellulaires en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA. Comme on le voit sur le diagramme, plusieurs concentrations d'extrait ont été appliquées aux cellules et chaque couleur représente une concentration différente (—250 µg/mL, —100 µg/mL, —50 µg/mL, —Control, —Medium).

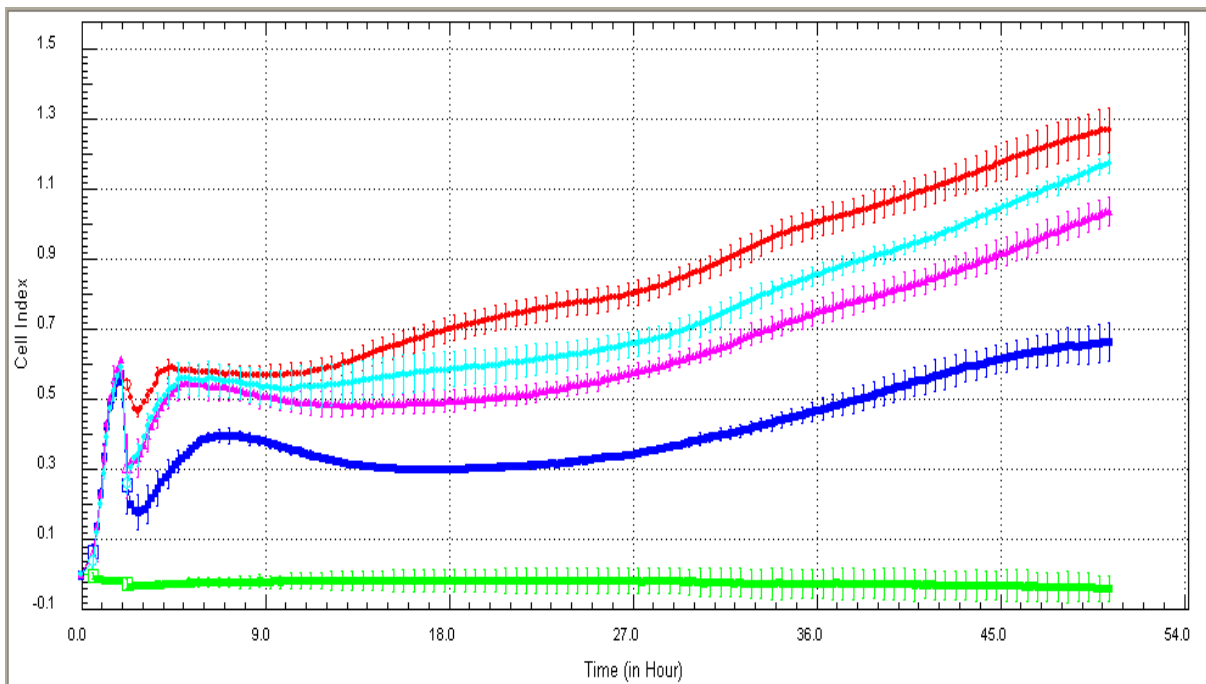


Figure 46 : Activité anticancéreuse de l'extrait méthanolique de *G. reboudiana* (MeOH-GR) contre la lignée cellulaire HeLa ($2,5 \times 10^4$ cellules / puits).

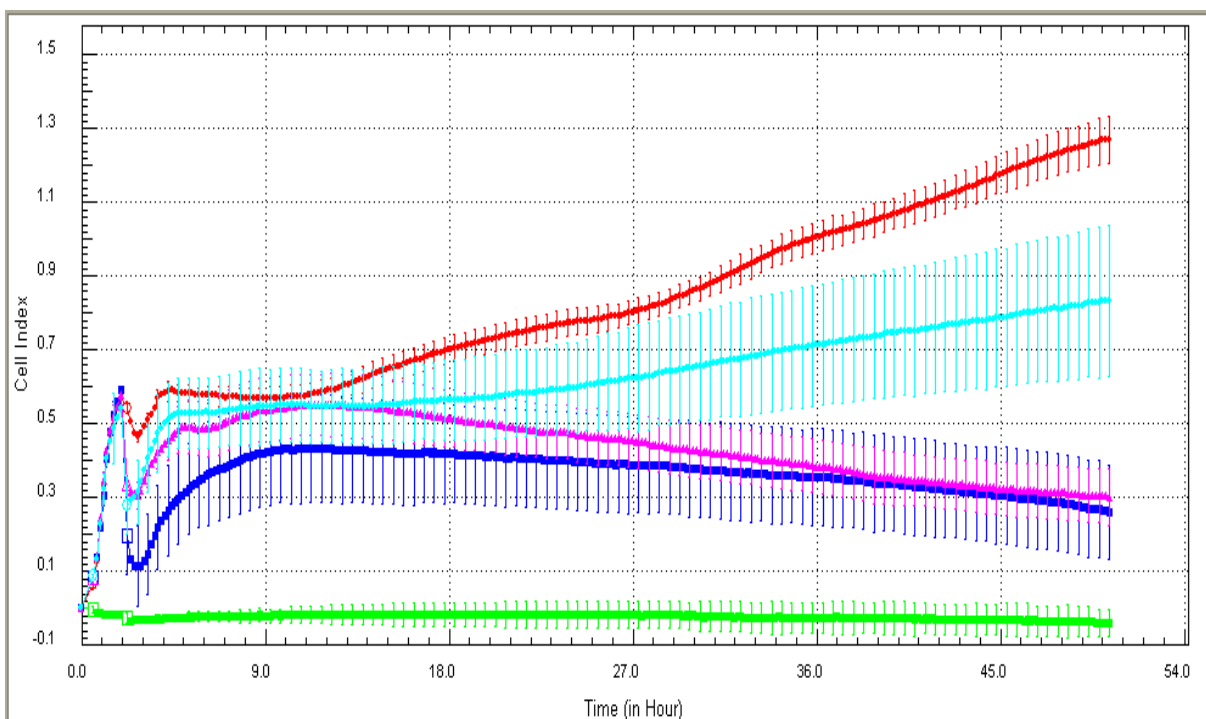


Figure 47 : Activité anticancéreuse de 5-fluorouracil comme témoin positif contre la lignée cellulaire HeLa ($2,5 \times 10^4$ cellules / puits).

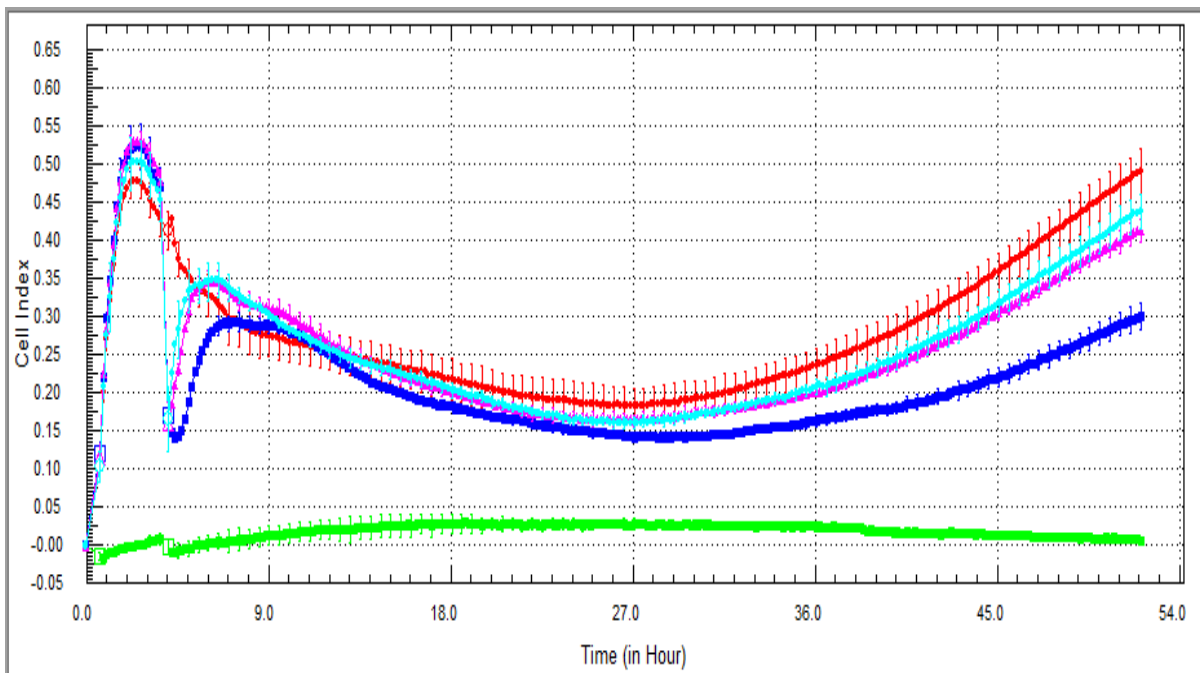


Figure 48 : Activité anticancéreuse de l'extrait metanolique de *Gaillonia reboudiana* (MeOH-GR) contre la lignée cellulaire C6 ($2,5 \times 10^4$ cellules / puits).

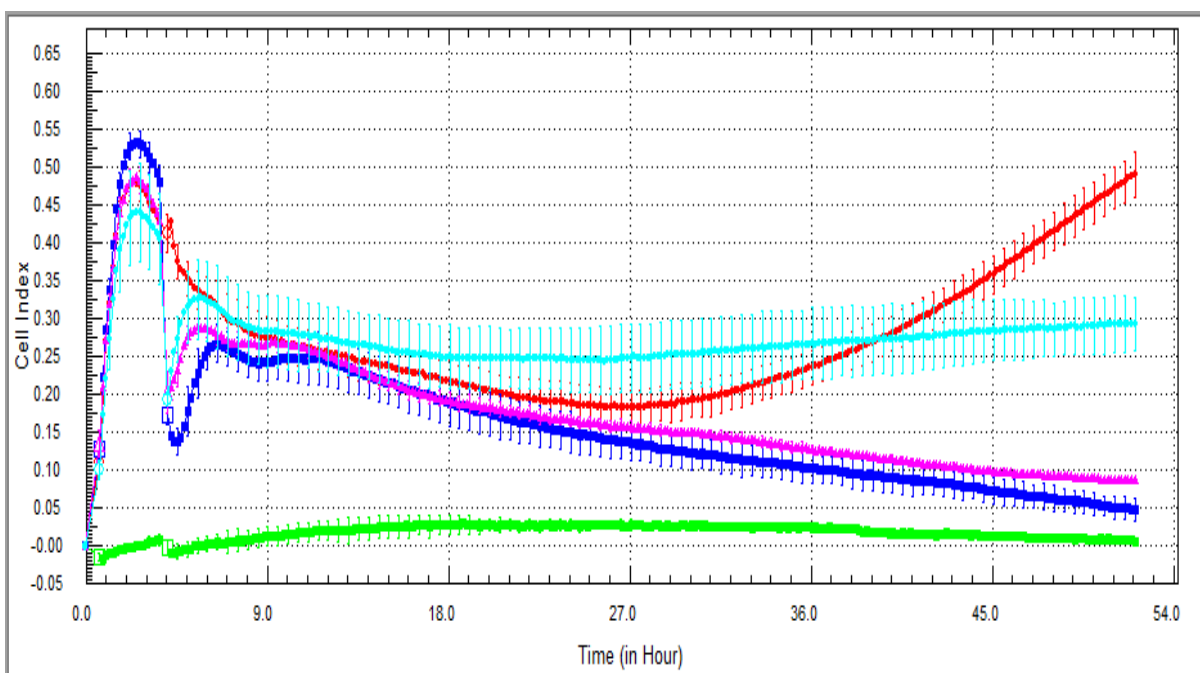


Figure 49 : Activité anticancéreuse de 5-florourasil comme témoin positif contre la lignée cellulaire C6 ($2,5 \times 10^4$ cellules / puits).

II.1.3.2. Activité antiproliférative

Les activités antiprolifératives de l'extrait MeOH-GR de la plante *G. reboudiana* et du standard ont été déterminées par rapport aux lignées cellulaires C6 et HeLa en utilisant le test ELISA de prolifération cellulaire BrdU. Le 5-fluorouracile (5-FU) a été utilisé comme contrôle positif. Les activités antiprolifératives des échantillons et du témoin positif ont été étudiées sur huit concentrations (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 et 100 µg / mL). Les valeurs IC₅₀ et IC₇₅ des extraits et du 5-FU ont été identifiées en utilisant les programmes ED₅₀ plus v1.0 (Tableau 13).

Comparant au 5-FU les résultats élucidés dans la figure 50 indiquent que l'extrait MeOH-GR n'a pas d'activité contre les cellules HeLa. Par contre, il a été détecté une activité très faible contre les cellules C6 par rapport au 5-FU (figure 51). La puissance d'inhibition (à 75 µg / mL) était: 5-FU > extrait de MeOH-GR.

Plusieurs concentrations de chaque extrait ont été appliquées aux cellules (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 and 100 µg / mL). Chaque substance a été testée deux fois en triple contre des lignées cellulaires. Les données montrent une moyenne de deux expériences individuelles (p <0,01).

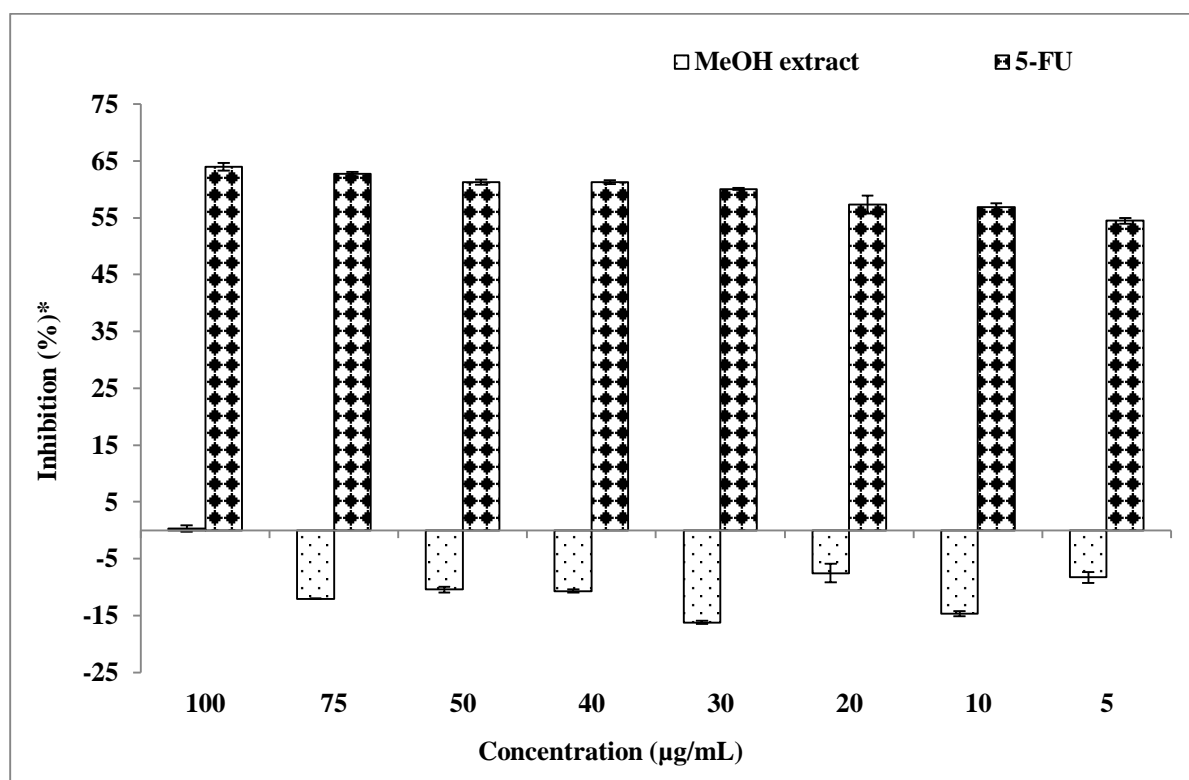


Figure 50 : Activité antiproliférative de l'extrait méthanolique de *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de 5-FU contre la lignée cellulaire HeLa (3×10^4 cellules / puits).

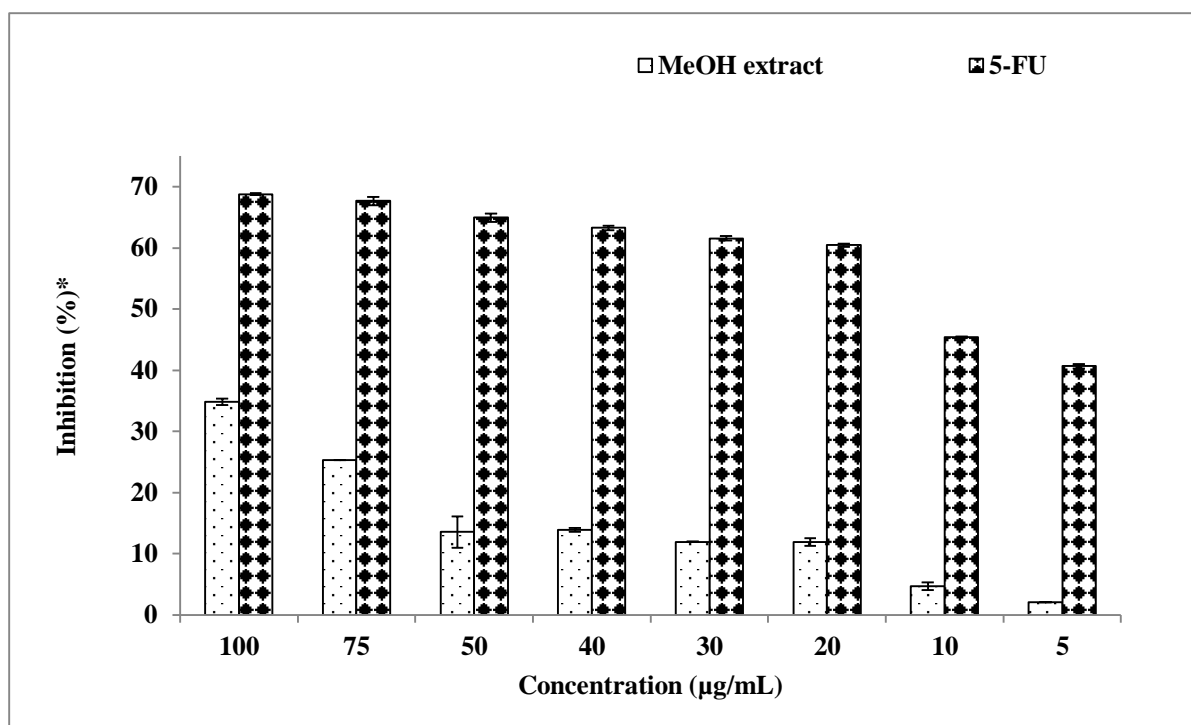


Figure 51 : Activité antiproliférative de l'extrait metanolique de *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de 5-FU contre la lignée cellulaire C6 (3×10^4 cellules / puits).

Les activités antiprolifératives par l'extrait MeOH-GR et 5-FU sont exprimées en termes d'IC₅₀ et d'IC₇₅ et sont données dans le tableau (13). La comparaison des valeurs d'IC₅₀ pour les lignées cellulaires HeLa et C6 indique que les lignées C6 sont les plus actives.

Tableau 13 : Valeurs IC₅₀ et IC₇₅ de l'extrait metanolique de *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de 5-fluorouracile, présenté par dosage antiprolifératif contre les lignées cellulaires HeLa et C6 (3×10^3 cellules / mL).

Echantillon	Les cellules HeLa		Les cellules C6	
	IC ₅₀	IC ₇₅	IC ₅₀	IC ₇₅
MeOH-GR	*	*	49.56	77.00
5-FU	**	**	**	12.03

* >100 µg/mL. ** <5 µg/mL.

II.1.3.3. Effect cytotoxique

L'effet cytotoxique des extraits a été déterminé par le test de fuite de la lactate déshydrogénase (LDH) contre la lignée cellulaire C6 et présenté en pourcentage de cytotoxicité comme indiqué

dans le tableau (14). Ce test repose sur l'utilisation des kits de détection de la cytotoxicité LDH. Comparant au 5-Flu l'extrait MeOH-GR ne possède pas des effets cytotoxiques

Tableau 14 : Pourcentage de cytotoxicité de l'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et le 5-FU présenté par le test de fuite du lactate déshydrogénase (LDH) contre la lignée cellulaire C6 (5 x 10³ cellules / mL).

Echantillon	Cytotoxicité (%)
MeOH-GR	0
5-FU	19

II.2. Les tests *in vivo*

II.2.1. Effet sur le taux d'MDA dans le foie, le rein et le cœur

Chez les rats recevant du PCP et en comparaison avec le groupe témoin (control), les résultats obtenus dans les figures (52, 53 et 54) montrent une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) du taux d'MDA dans les homogénats des foies, des reins et des cœurs, respectivement. Mais, une normalisation hautement significative ($p < 0,001$) a été constatée lors un prétraitement par l'extrait de la plante (50 et 100 mg / kg) et la vitamine E. Ces résultats indiquent que les deux doses de l'extrait et la vitamine E ont fourni une protection significative ($p < 0,001$) contre la peroxydation lipidique induite par le PCP.

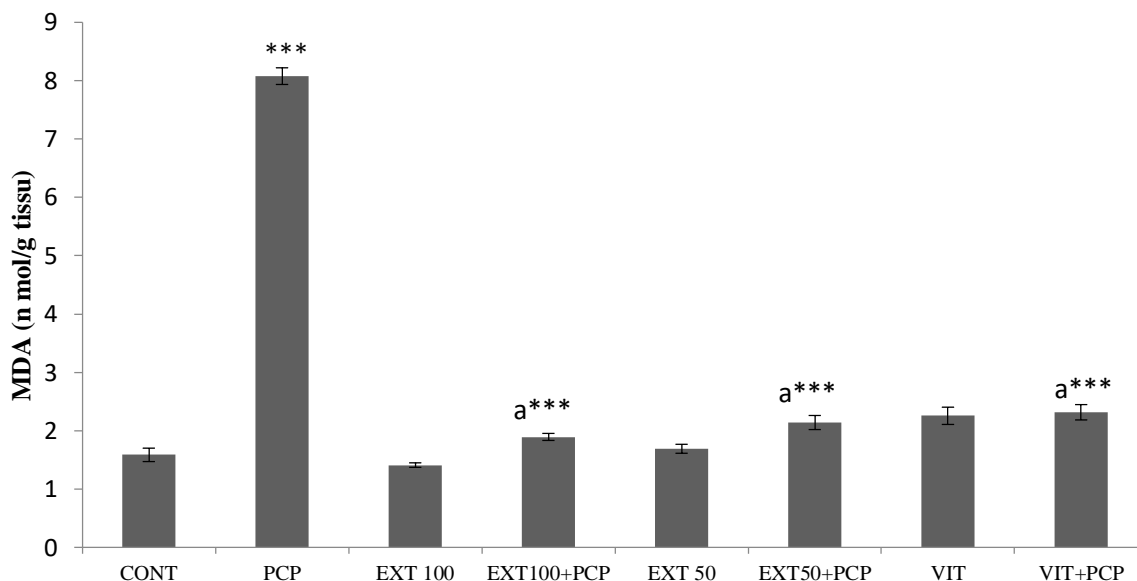


Figure 52: Effet du PCP, de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique dans les homogénats hépatiques. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; EXT 100: extrait de plante à la dose de 100 mg / kg; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

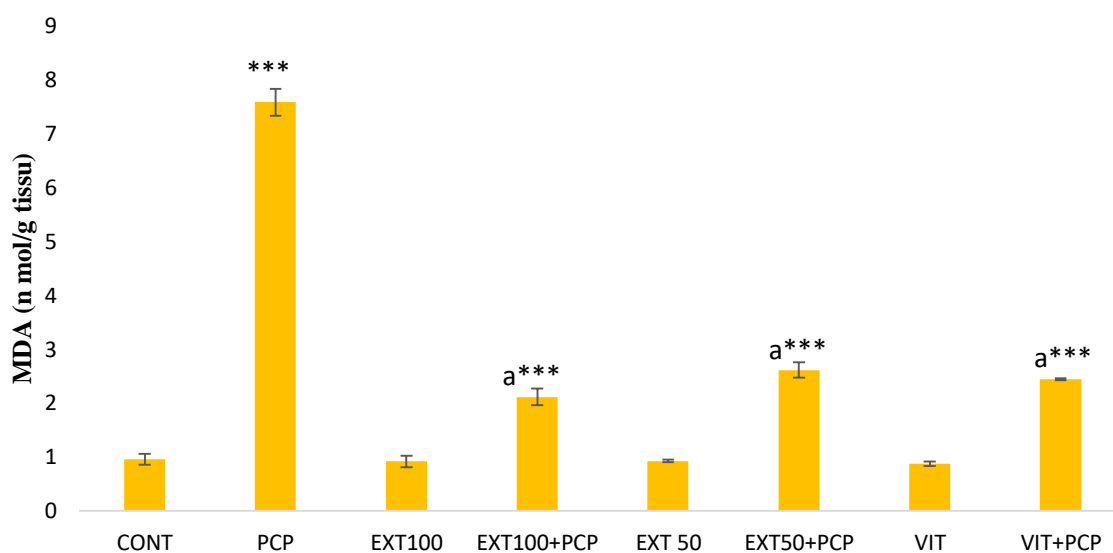


Figure 53 : Effet du PCP, de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique (MDA) dans les homogénats des reins. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; EXT 100: extrait de plante à la dose de 100 mg / kg; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

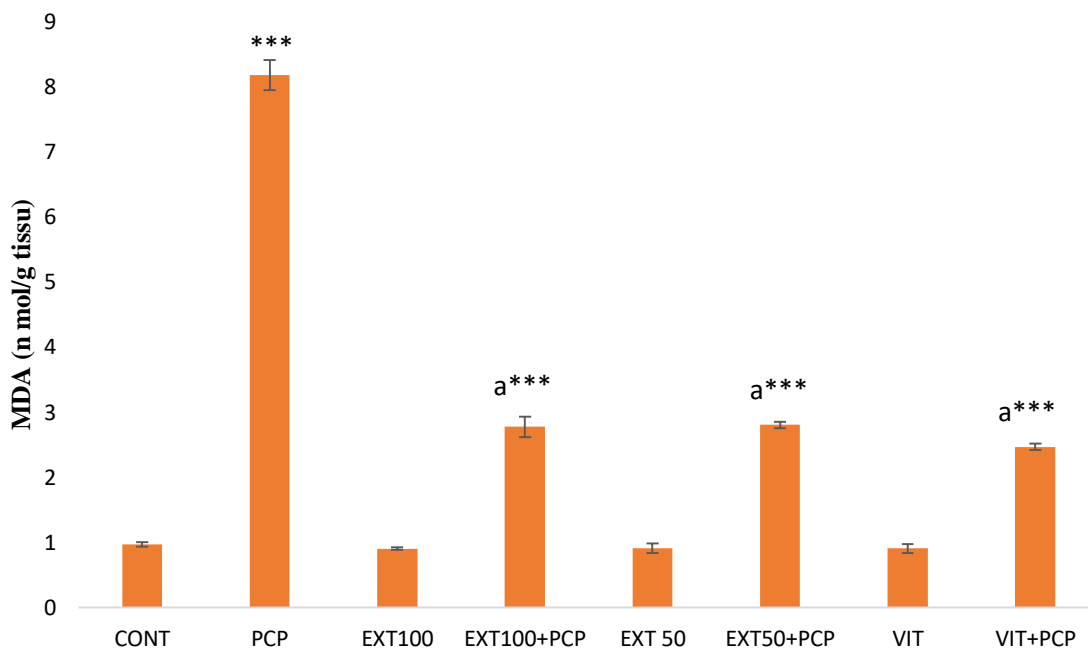


Figure 54 : Effet du PCP, de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine E sur la peroxydation lipidique (MDA) dans les homogénats des cœurs. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; EXT 100: extrait de plante à la dose de 100 mg / kg; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

II.2.2. Effet sur le taux du glutathion dans le foie, le rein et le cœur

Les résultats illustrés dans les figures (55, 56 et 57) montrent une diminution hautement significative ($p < 0,001$) du taux de GSH au niveau du foie, du rein et du cœur des rats recevant le PCP par rapport au groupe témoin non traité.

Aussi bien, les résultats montrent un effet remarquable de prétraitement avec l'extrait méthanolique soit à la dose 50 ou 100 mg/kg, sur le taux du glutathion réduit. Une augmentation très significative ($p < 0,001$) du taux de GSH au niveau des homogénats des rats traités par les deux doses de cet extrait par rapport au groupe traité par le PCP.

Les différents homogénats des groupes traités avec l'extrait méthanolique à la dose 50 ou 100 mg/kg ainsi qu'avec la vitamine E ont un taux de GSH plus proche à celui du groupe non traités.

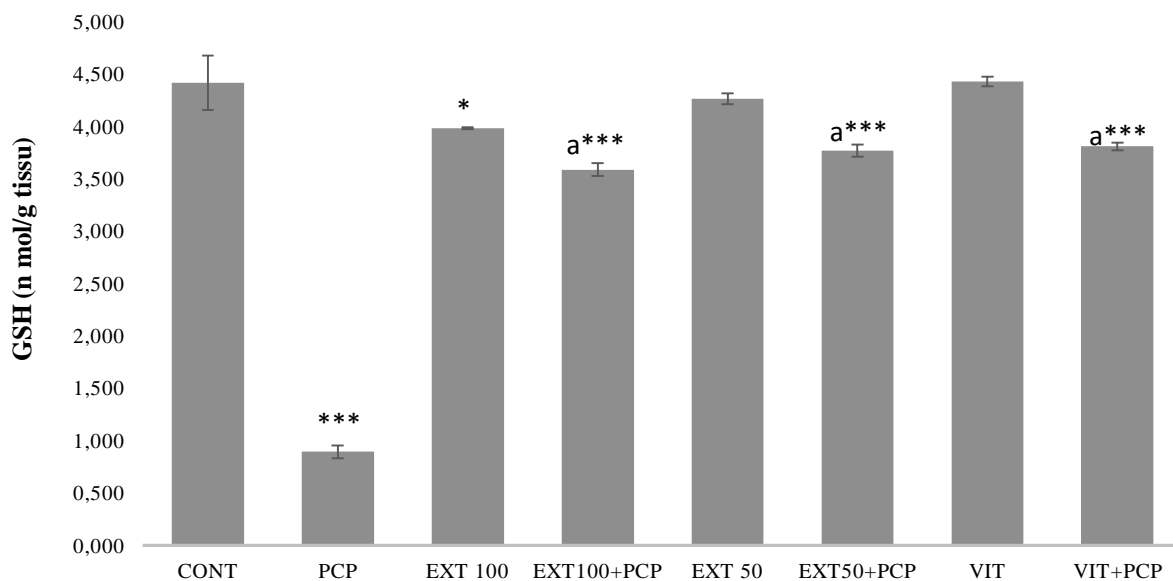


Figure 55 : Effet de la PCP, de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine E sur les niveaux de GSH dans les homogénats des foies. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; EXT 100: extrait de plante à la dose de 100 mg / kg ; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). *p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

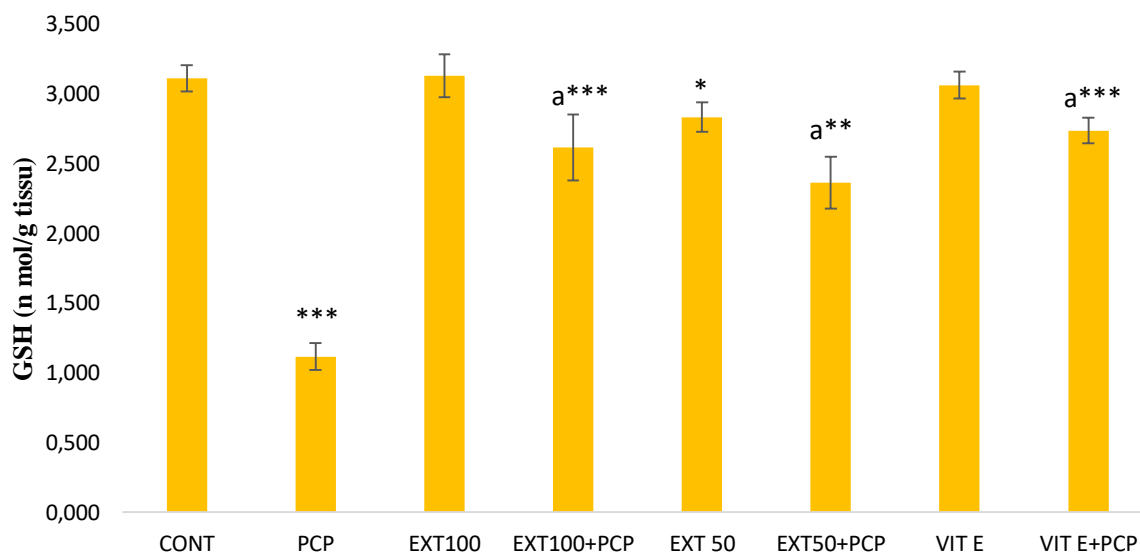


Figure 56 : Effet de la PCP, de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine E sur les niveaux de GSH dans les homogénats des reins. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; EXT 100: extrait de plante à la dose de 100 mg / kg ; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). *p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

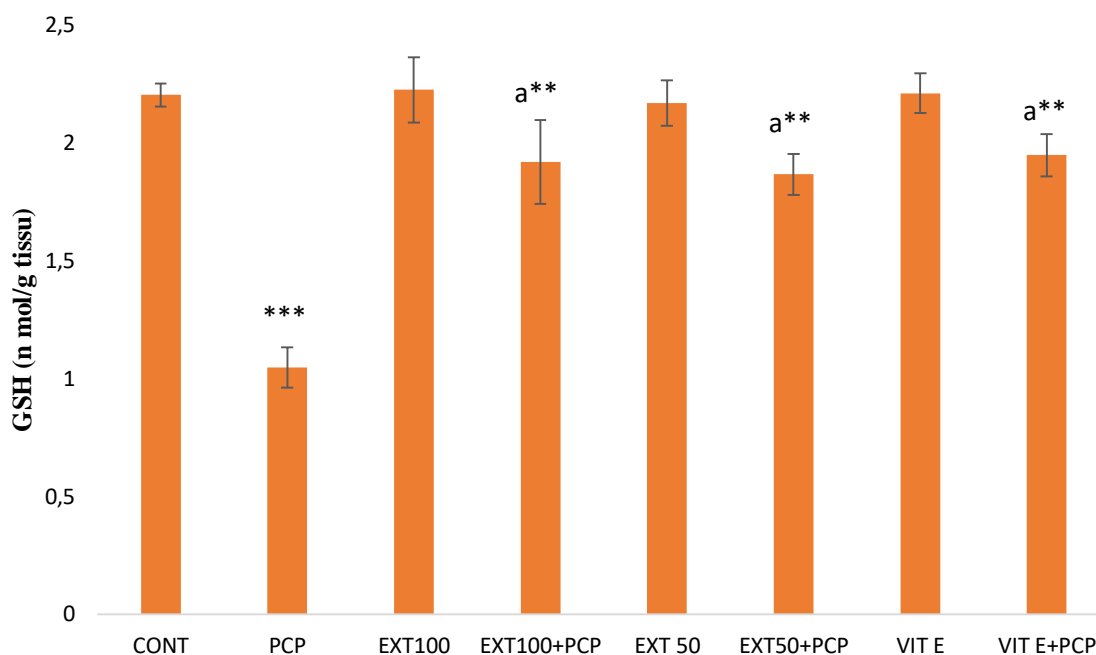


Figure 57 : Effet de la PCP, de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine E sur les niveaux de GSH dans les homogénats des cœurs. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; EXT 100: extrait de plante à la dose de 100 mg / kg ; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). *p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

II.2.3. Effet sur l'activité de GPx dans le foie, le rein et le cœur

Le dommage oxydatif induit par le PCP a démuné significativement ($P < 0,001$) l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) par rapport au groupe témoin, en provoquant une altération significative ($P < 0,001$) du système antioxydant hépatique ainsi que du système rénale et cardiaque. Par ailleurs, Cette activité est accélérée suite à La pré-administration de l'extrait de plante et la vitamine E.

De plus, et chez les rats recevant la vitamine E ou l'extrait soit à la dose 50 ou 100 mg/kg, cette activité enzymatique était plus proche à celle du groupe témoin (figures: 58, 59 et 60), ce qui indique que l'activité enzymatique du système antioxydant de foie, du rein et du cœur est conservée à son niveau normal.

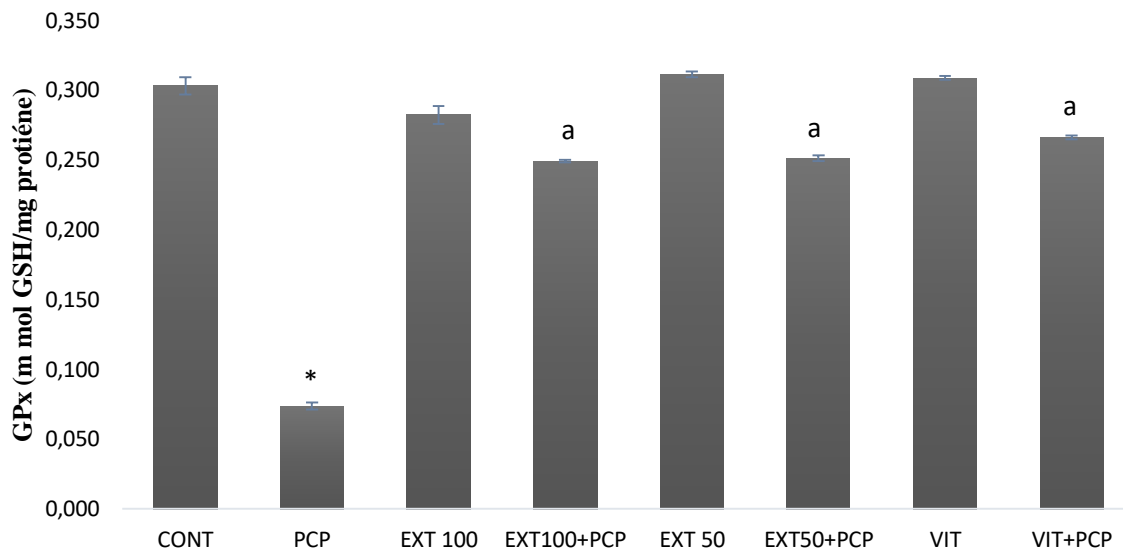


Figure 58 : Effet du PCP, de l'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine E sur l'activité enzymatique du GPx dans les homogénats hépatiques. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; EXT 100: extrait de plante à la dose de 100 mg / kg ; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). *p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

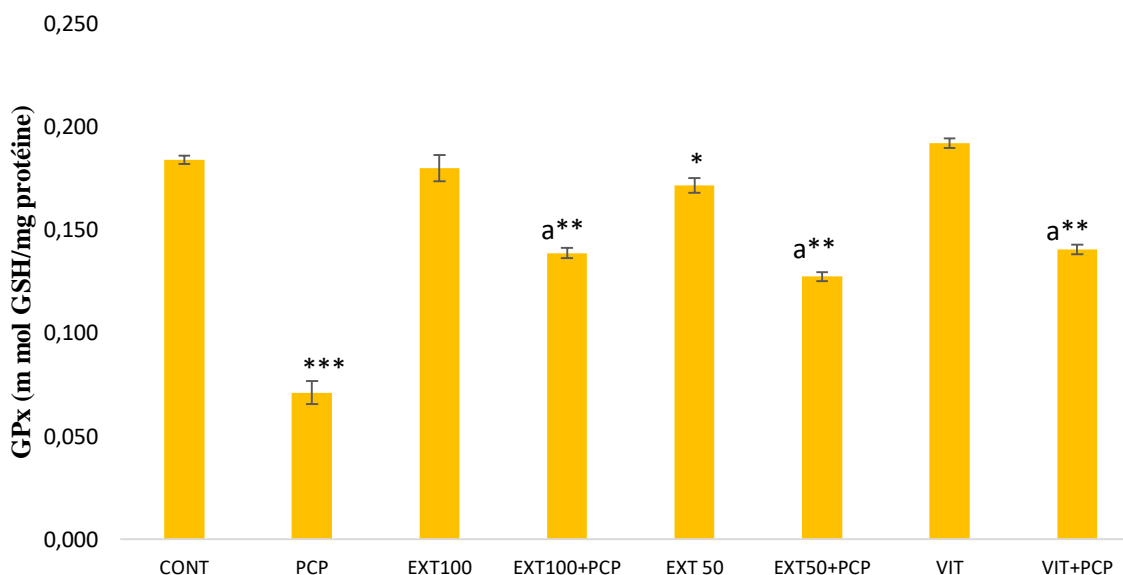


Figure 59 : Effet du PCP, de l'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine E sur l'enzyme antioxydante (GPx) dans les homogénats des reins. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; EXT 100: extrait de plante à la dose de 100 mg / kg ; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). *p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

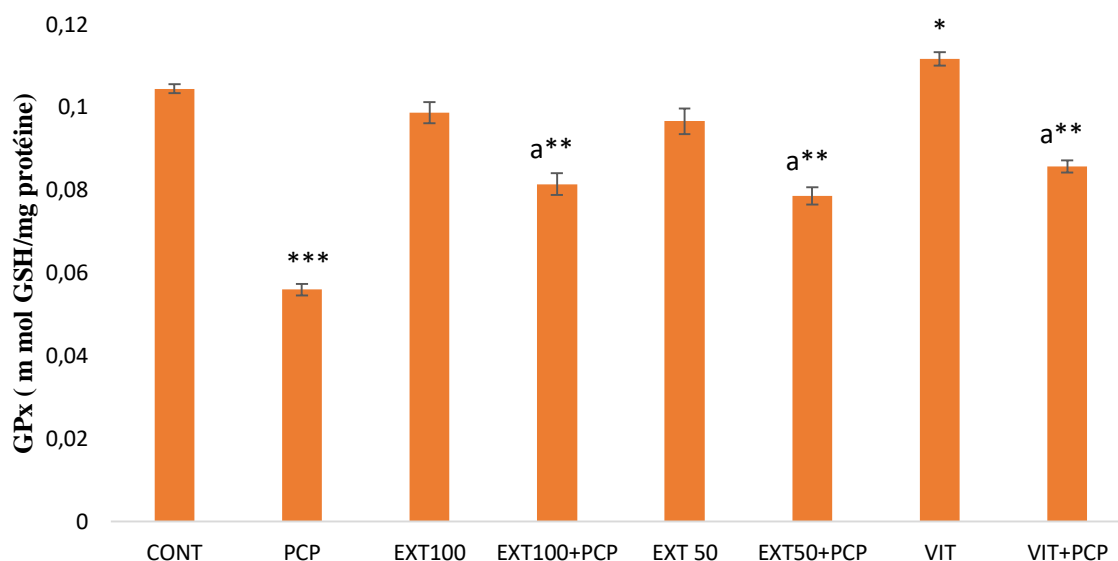


Figure 60: Effet du PCP, de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine E sur l'enzyme antioxydante (GPx) dans les homogénats des cœurs. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; EXT 100: extrait de plante à la dose de 100 mg / kg ; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type (n= 6). *p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

II.2.4. Résultats des paramètres biochimiques

L'effet de PCP sur la fonction hépatique est illustré dans le tableau (15). Les résultats montrent une augmentation significative des niveaux sériques d'AST (p <0,01), d'ALT (p <0,05) et de bilirubines totaux (p <0,01) par rapport au groupe témoin.

La pré-administration d'extrait de plante à la dose 50 ou 100 mg/kg ou bien de vitamine E a abaissé significativement l'activité d'AST et d'ALT (p <0,05) et le niveau des bilirubines totaux (p <0,05) par rapport au groupe recevant le PCP seul. Un maintien des niveaux normaux de transaminases sériques a été dénoté dans les groupes traités par les deux doses de l'extrait de plante et le groupe recevait la vitamine E.

Une augmentation significative (p <0,01) du taux sérique du cholestérol et de triglycérides a été remarquée chez les rats traités par le PCP, par rapport au groupe témoin (tableau: 15). Alors que le prétraitement avec les deux doses de l'extrait de la plante ou avec la vitamine E a diminué significativement les niveaux de cholestérol (p <0,01) et de triglycérides (p <0,01) sériques.

Aussi bien l'administration du PCP aux animaux a provoqué une augmentation remarquable des taux sériques de l'urée ($p < 0,01$) et de la créatinine ($p < 0,001$). Ces paramètres sériques sont abaissés significativement chez les rats traités par la vitamine E ($p < 0,01$) ou par l'extrait de la plante à la dose 100 mg/kg ($p < 0,01$) (tableau: 15).

Tableau 15: Effet du PCP, de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine E sur les paramètres biochimiques (sériques) des rattes. AST, ALT, CHO : cholestérol, TRI : triglycérides, URE : urée, BIL-T : bilirubines totaux, URE : créatinines. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; EXT 100: extrait de plante à la dose de 100 mg / kg; Vit: vitamine E. NM : not made (n'est pas réalisés).

Les valeurs sont des moyennes \pm écart type ($n = 6$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

	CONT	PCP	EXT100	EXT 100+PCP	EXT 50	EXT 50+PCP	VIT	VIT+PCP
AST (U/L)	66 \pm 2,51	112,25 \pm 3,15**	71,5 \pm 2,06	79,33 \pm 0,89 a*	NM	NM	67,5 \pm 3	76,666 \pm 2,32 a**
ALT (U/L)	32,6 \pm 1,33	57,67 \pm 1*	35,66 \pm 3,74	40,5 \pm 1,37a*	30,6 \pm 2,80	43,5 \pm 0,46a*	30,5 \pm 5,4	47,8 \pm 1,81a*
CHO(mg/dL)	39 \pm 1,89	59,5 \pm 3,16*	40,8 \pm 2,53	42,67 \pm 3,23 a*	37,33 \pm 1,76	40,66 \pm 1,77a**	36,5 \pm 2,43	41,5 \pm 3,96a*
TRI(mg/dL)	99,67 \pm 1,17	130,83 \pm 0,23*	93,8 \pm 0,70	97,66 \pm 0,65 a*	93,33 \pm 0,36	93,167 \pm 0,46a**	95,5 \pm 0,77	99,83 \pm 0,64a*
URE (g/L)	0,351 \pm 0,56	0,648 \pm 0,31**	0,33 \pm 0,03	0,411 \pm 0,03 a*	NM	NM	0,353 \pm 0,05	0,406 \pm 0,03a*
CRE(mg/L)	5,925 \pm 0,56	12,305 \pm 0,31***	6,238 \pm 0,53	9,31 \pm 0,52 a*	NM	NM	5,7166 \pm 0,46	8,893 \pm 0,49 a*
BIL-T (mg/L)	6,00 \pm 0,27	12,043 \pm 0,17**	5,016 \pm 0,59	7,971 \pm 0,12 a*	NM	NM	5,1683 \pm 0,44	8,268 \pm 0,51 a*

II.2.5. Evaluation de poids corporels des animaux

La figure (61) dévoile le pourcentage d'évolutions de poids des animaux au cours de l'expérience. Les résultats montrent une augmentation normale du poids corporel chez les rats traités par l'extrait et la vitamine E par rapport au groupe témoins.

Le pourcentage de variation de poids des rats recevant le PCP est stabilisé (8%) à partir du 7^{ème} jour de traitement en présentant une diminution significative ($p < 0,01$) par rapport au celui des rats non traité.

Par contre le poids corporel est régulièrement normalisée chez les rats prétraités avec les deux doses de l'extrait (50 ou 100 mg/kg) ou avec la vitamine E en présentant une élévation significativement importante ($p < 0,01$) par rapport au celui des rats recevant le PCP.

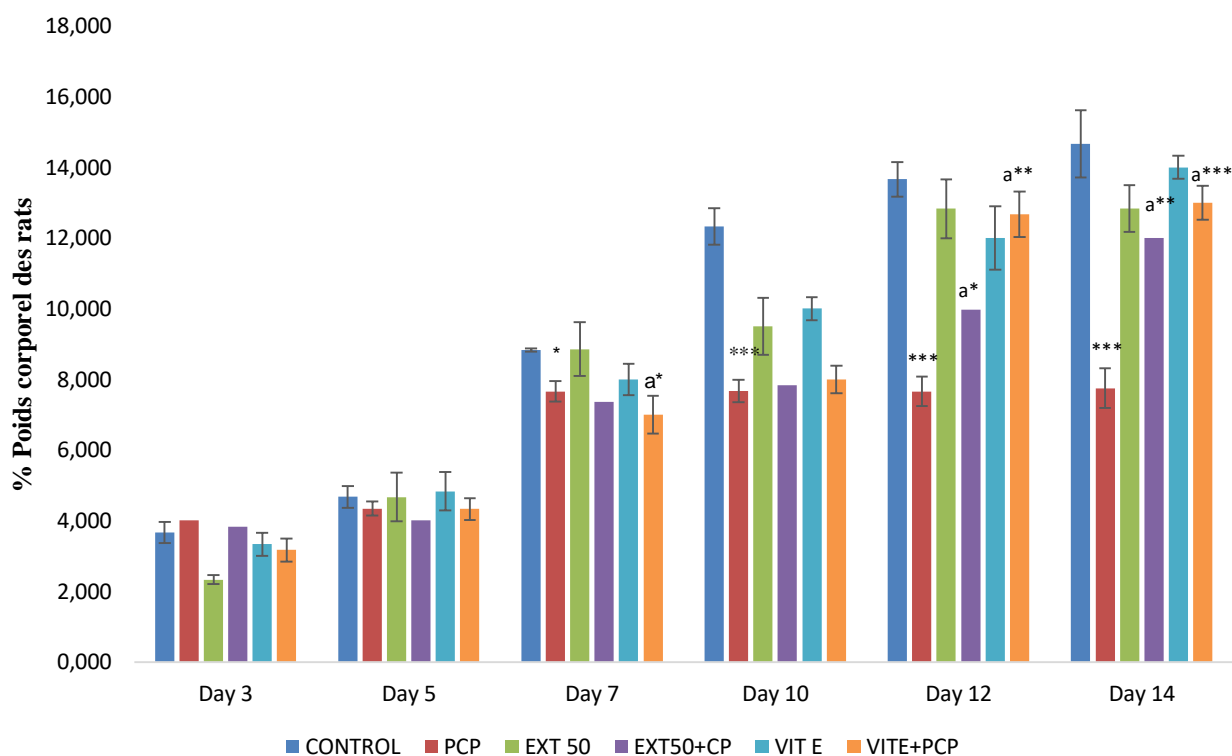


Figure 61: Effet du PCP, de l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) et de la vitamine E sur le poids des rattees. Cont: groupe de contrôle; EXT 50: extrait de plante à la dose de 50 mg / kg; VIT: vitamine E. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type ($n= 6$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, par rapport au groupe témoin. a: par rapport au groupe PCP.

III. Conclusion

Les antioxydants dans les produits ordinaires offrent diverses capacités pour protéger et défendre les lésions oxydatives en obstruant ou en bloquant les radicaux libres. Pour cette raison,

cette étude est effectuée afin d'évaluer les effets protecteurs et antioxydant de la plante *G. reboudiana* en examinant son extrait méthanolique.

Les possessions antioxydantes de cet extrait sont révélées par son conception très élevée en Polyphénols et en flavonoïdes. Ce qui lui permet d'agir significativement comme un réducteur puissant, un chélateur de Fe^{+2} , un piègeur de radicaux libres et un inhibiteur de la peroxydation lipidique en comparaison avec les standards antioxydants dans les mêmes conditions. En outre, cet extrait a présenté une faible protection contre les dommages oxydatifs de l'ADN plasmidique induit par le H_2O_2 . Mais, cet extrait ne possède pas des effets antiprolifératifs contre les deux lignées cellulaires (C6 et HeLa) utilisées dans cette étude.

Suite à notre étude *in vitro*, une autre étude expérimentale *in vivo* a été effectuée afin de prouver l'efficacité de cet extrait. Des rats femelles Wistar Albinos ont été utilisés dans cette étude. Une intoxication aigue durant quinze jours a été induite chez les rattes avec une dose de 20 mg / kg de PCP. Les dosages effectués sur les homogénats (foie, reins et cœur) de ces animaux montrent une augmentation du taux d'MDA avec une diminution du taux de GSH et de l'activité enzymatique de GPx. Alors que le dosage des paramètres biochimiques dans le sérum comme l'activité des AST et ALT et le taux de bilirubines totaux, de cholestérol, des triglycérides, de l'urée et des créatinines ont montré une augmentation très importante en indiquant une altération du foie, du rein, du cœur, du système antioxydant et un déséquilibre dans le profile lipidique des distinctes cellules.

D'autre part, le prétraitement par l'extrait méthanolique de cette plante a bien fourni des effets antioxydants, hépato-protecteurs, néphro-protecteurs et cardio-protecteurs puissants contre la toxicité induite par le PCP. Cette protection est traduite par une réduction de la peroxydation lipidique et particulièrement une diminution de la concentration des composés nocifs résultants de cette réaction dans les homogénats hépatiques, rénales et cardiaques comme le MDA. Et par conséquent, la réduction des niveaux d'AST, d'ALT et de bilirubines totaux sériques et la normalisation des taux de cholestérol, de triglycérides, d'urée et de créatinine dans le sérum. Les propriétés antioxydantes de cet extrait ont été révélées aussi par la restauration du taux de GSH et de l'activité enzymatique de GPx dans les différents homogénats indiquant son capacité d'agir comme un antioxydant puissant et protecteur de la fonction de ces organes.

En conclusion, l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* est un antioxydant puissant contient une teneur très importante en substance bioactives agit comme un protecteur parfaitement puissant sur le plan structurel et fonctionnel des organes étudiés.



3- Etude histologique

1. Etude histologique

Après dissection des rattes étudiées dans les deux études expérimentales précédentes, des échantillons de foies, de reins et de cœurs ont été excisés, rincés avec une solution saline normale et traités distinctement pour des interprétations histologiques.

Le matériau a été conservé dans le fixateur (formol à 10%) pendant 48 heures, séché par des cycles d'éthanol en série (70% à l'absolu) et placé dans de la paraffine. Les fragments ont été coupés en une épaisseur de 4 µm qui a été colorée avec de l'hématoxyline de Harris et de l'éosine, puis observés en utilisant la microscopie optique (Leica DM 1000, Allemagne), au niveau de laboratoire de cytologie anatomique et pathologique, Centre hospitalier universitaire. Constantine. Algérie.

2. Résultats

2.1. Etude histologique des coupes de foies

Les Photomicrographies histologiques des coupes hépatiques des groupes prétraités par les différents extraits ou par la vitamine E présentent une structure proche à celle de groupe témoin (Image 01), une architecture normale avec veine centrale normale, des hépatocytes polygonaux, des noyaux arrondis et des sinusoides sanguins normaux (Image 03, 04, 05 et 06). Le prétraitement par l'un des extraits ou par la vitamine E a fourni un maintien de la structure hépatique et une résistance contre le PCP en diminuant les changements structurels induits par ce dernier.

Alors que celui du groupe traité par le PCP a démontré des lésions complètes de la structure hépatique, une dilatation avec une congestion de la veine centrolobulaires et des sinusoides, des cellules hépatiques à noyaux pycnotiques avec des nécroses hépatocellulaires et des binucléations (Image 02).

2.2. Etude histologique des coupes de reins

Les Photomicrographies histologiques des coupes des reins des animaux traités par le PCP ont montrés des lésions rénales : des congestions interstitielles et glomérulaires, des dilatations tubulaires, des nécroses focales des tubules, des nécroses glomérulaires et interstitielles importantes (Image 08).

Alors qu'il n'y avait pas des modifications au niveau des reins des animaux traités par la vitamine E (Image 08) par apport aux reins de groupe témoin (Images 07).

Les observations histologiques observé chez les rats prétraités par l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* à la dose 50 mg/kg et l'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* à la dose 100 mg/kg ont bien montré des dilatations tubulaires et des congestions glomérulaire plus un œdème interstitiel. Ces observations sont illustrées dans les images (10) et (11) ci-dessous, respectivement.

2.3. Etude histologique des coupes de cœurs

La Photomicrographie histologique du cœur témoin a présenté une architecture composée des faisceaux de fibres musculaire stries (histologie normale), celui-là est illustré dans l'image (12).

Bien que celui du groupe traité par PCP a démontré des changements morphologiques au niveau de leurs architectures (Image 13). Les lésions cardiaques sont minimales, limitées à la congestion et l'œdème avec une nécrose focale intéressant de rares cellules myocardiques (fibres).

Chez les rats prétraités par l'un des deux extraits ou par la vitamine E, l'étude histologique a montré que des congestions et œdème au niveau de leurs fragments de cœurs, comme il est présenté dans les images 14 et 15.

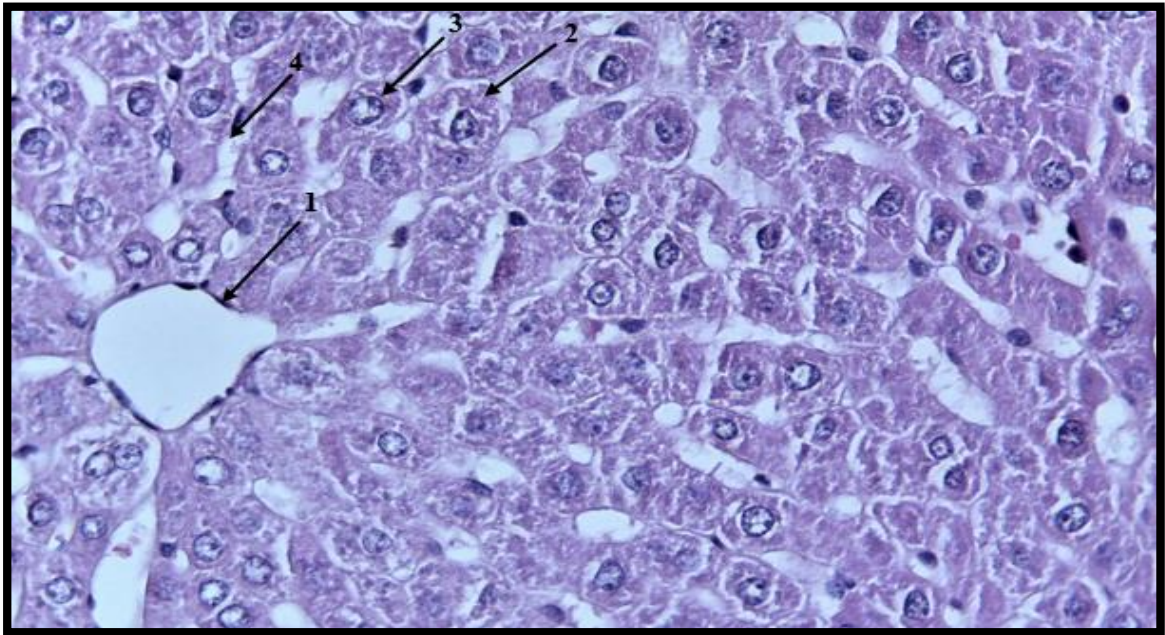


Image 01: Photomicrographie histologique du foie d'un rat témoin (X400).

1: Aspect normal avec veine centrale normale, **2:** hépatocytes polygonaux, **3:** un noyau arrondi, **4:** sinusoides sanguins.

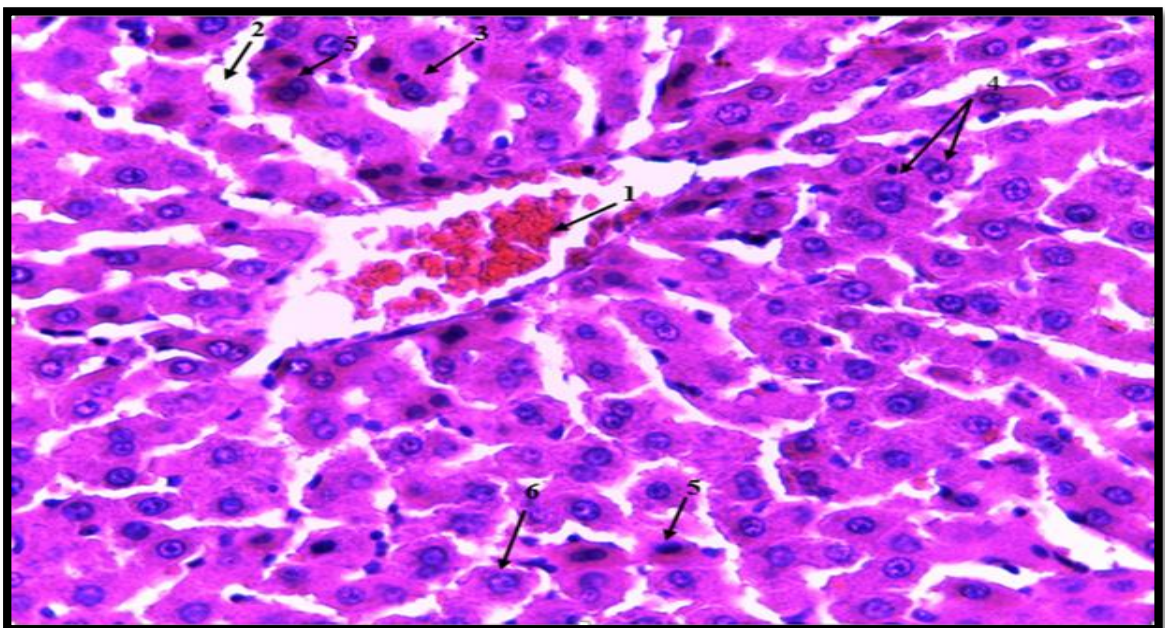


Image 02: Photomicrographie histologique du foie d'un rat traité avec le PCP à la dose 20 mg/kg (X400).

1: Dilatation et congestion de la veine centrolobulaire, **2:** Dilatation des sinusoides, **3:** Cellules hépatiques pycnotiques, **4:** Binucléation des hépatocytes, **5:** Nécrose hépatocellulaire, **6:** Ballonnement des hépatocytes.

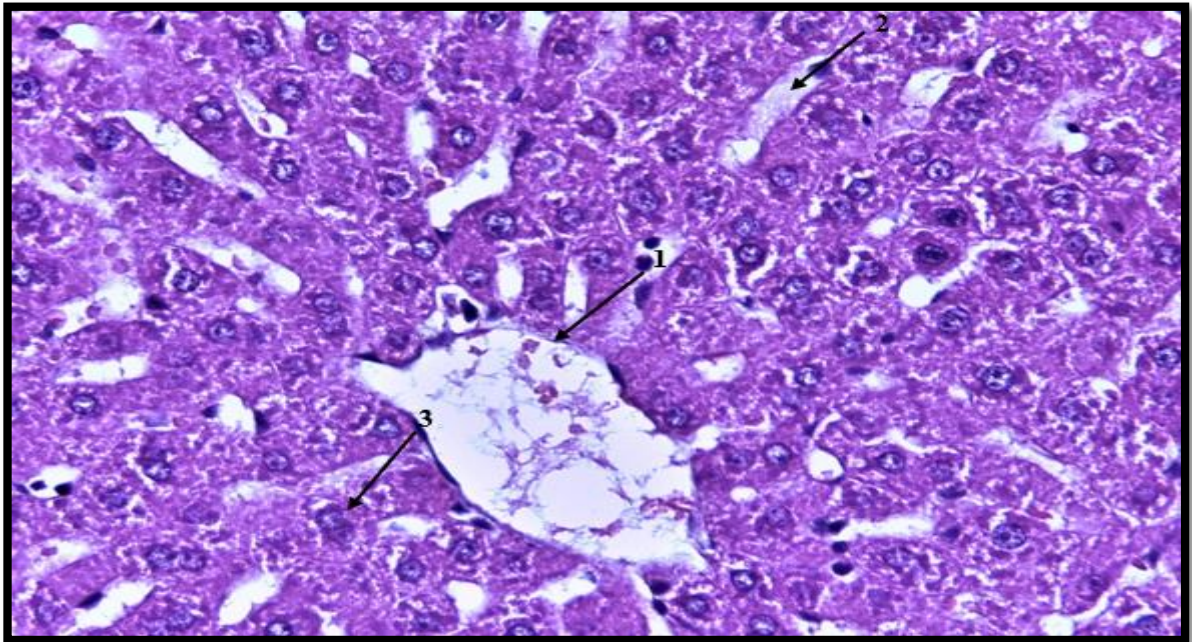


Image 03: Photomicrographie histologique du foie traité avec l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* à la dose 50 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400).

1: Légère dilatation et œdème de la veine centrolobulaire, **2:** Légère dilatation des sinusoides, **3:** Binucléation des hépatocytes.

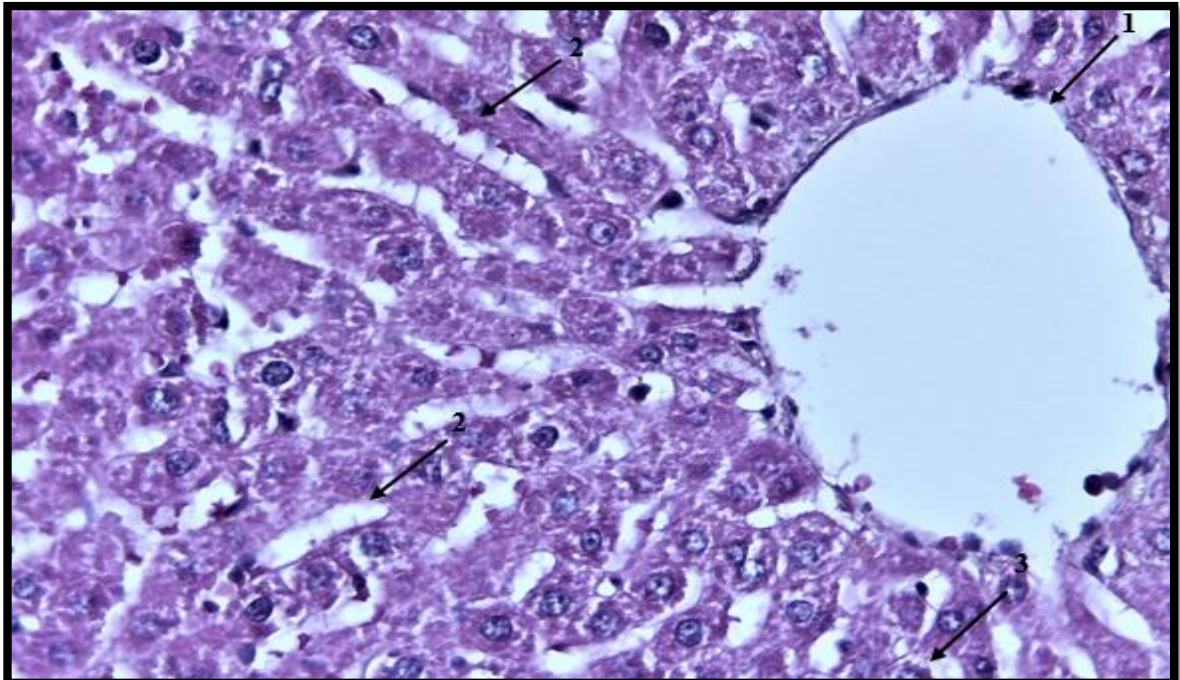


Image 04: Photomicrographie histologique du foie traité avec la vitamine E à la dose 100 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400).

1: Dilatation de la veine centrolobulaire, **2:** Légère dilatation des sinusoides, **3:** Ballonnement et clarification des hépatocytes.

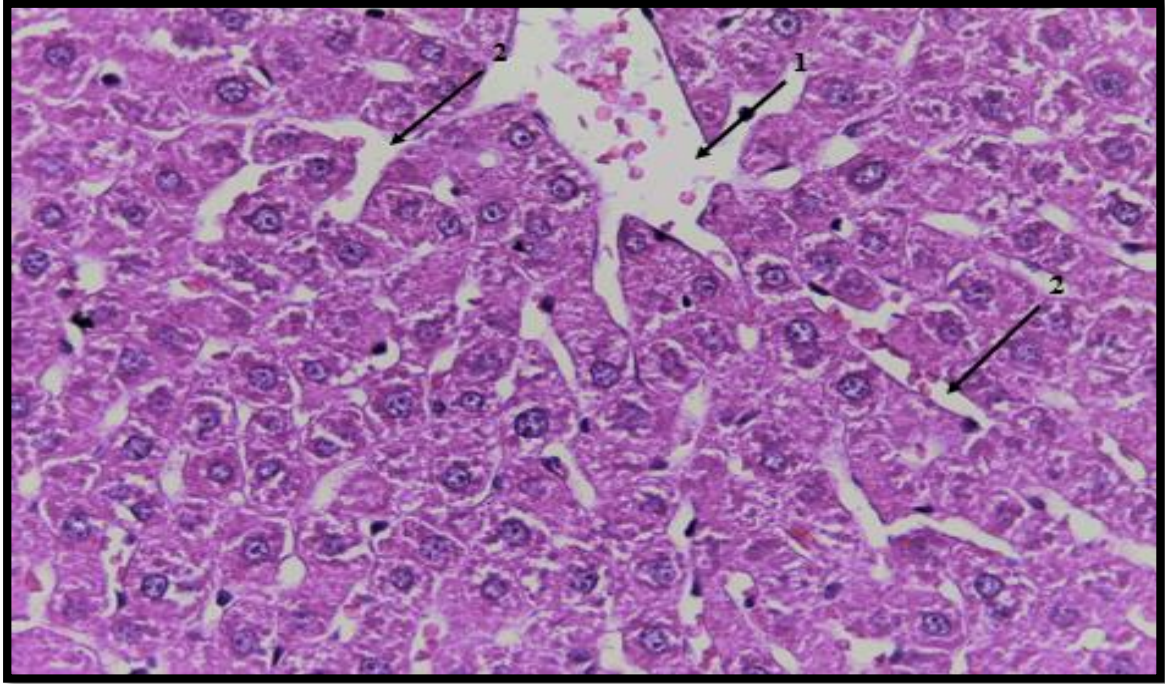


Image 05: Photomicrographie histologique du foie d'un rat traité avec l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* à la dose 50 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400).

1: Légère dilatation et congestion de la veine centrolobulaire, **2:** Dilatation et peu de congestion des sinusoides.

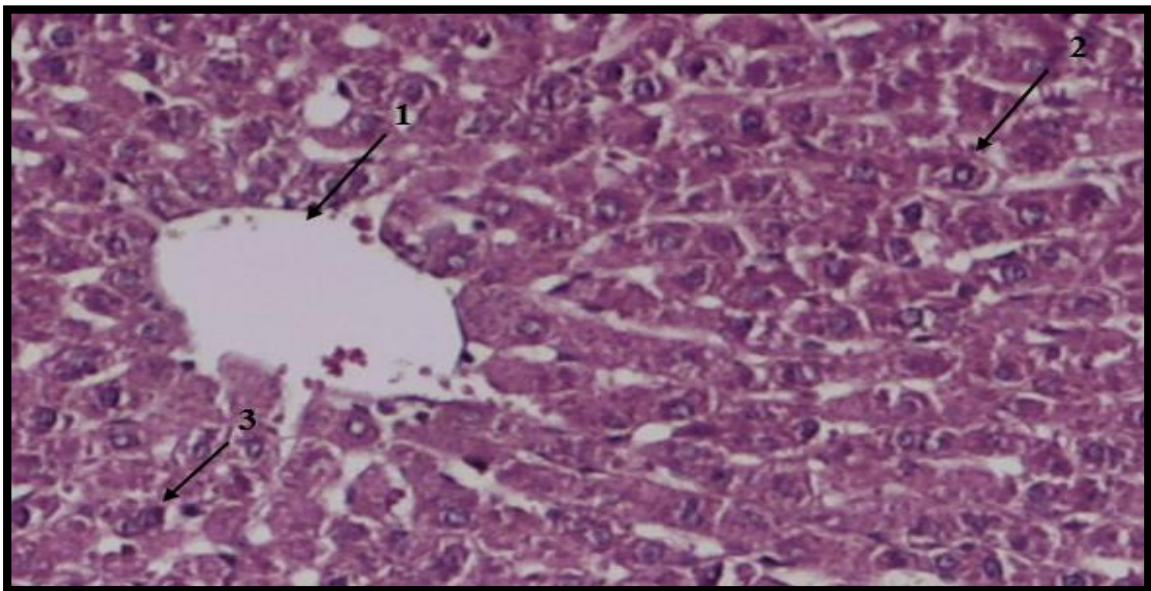


Image 06: Photomicrographie histologique du foie d'un rat traité avec l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* à la dose 100 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400). 1: Légère dilatation de la veine centrolobulaire, **2:** Ballonnement et clarification des hépatocytes, **3:** Binucléation des hépatocytes.

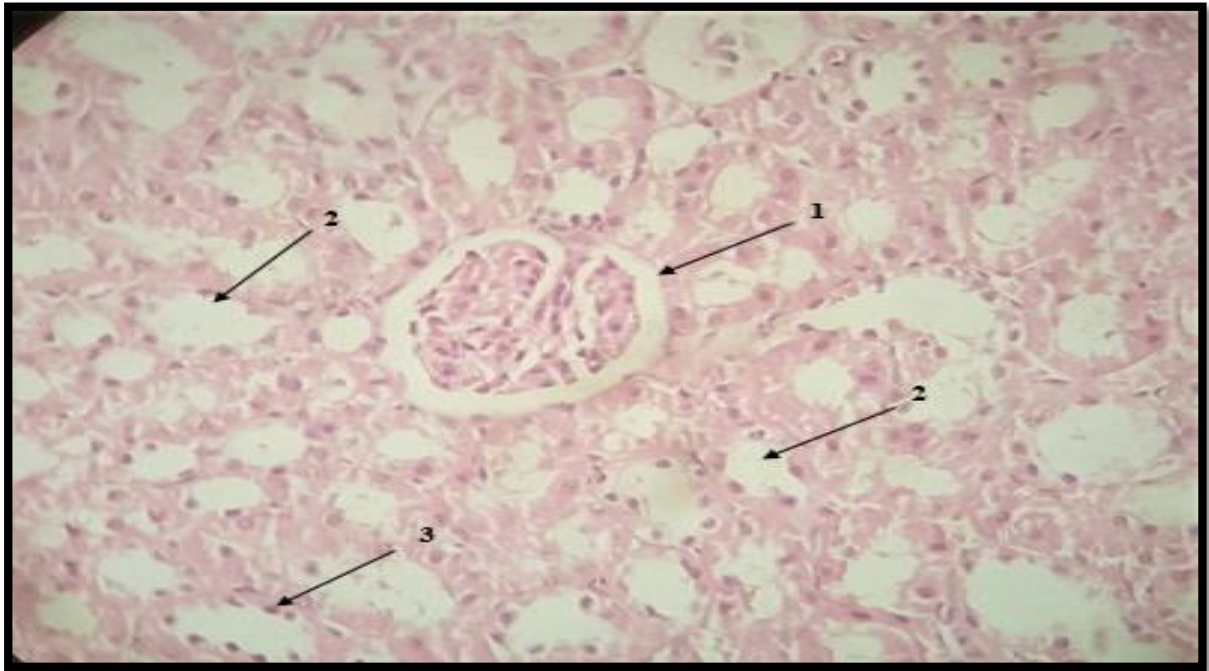


Image 07: Photomicrographie histologique du rein d'un rat témoin.

Architecture conservée un aspect normal des glomérules (1) et des tubes rénaux (2) avec épithélium cubique simple (3).

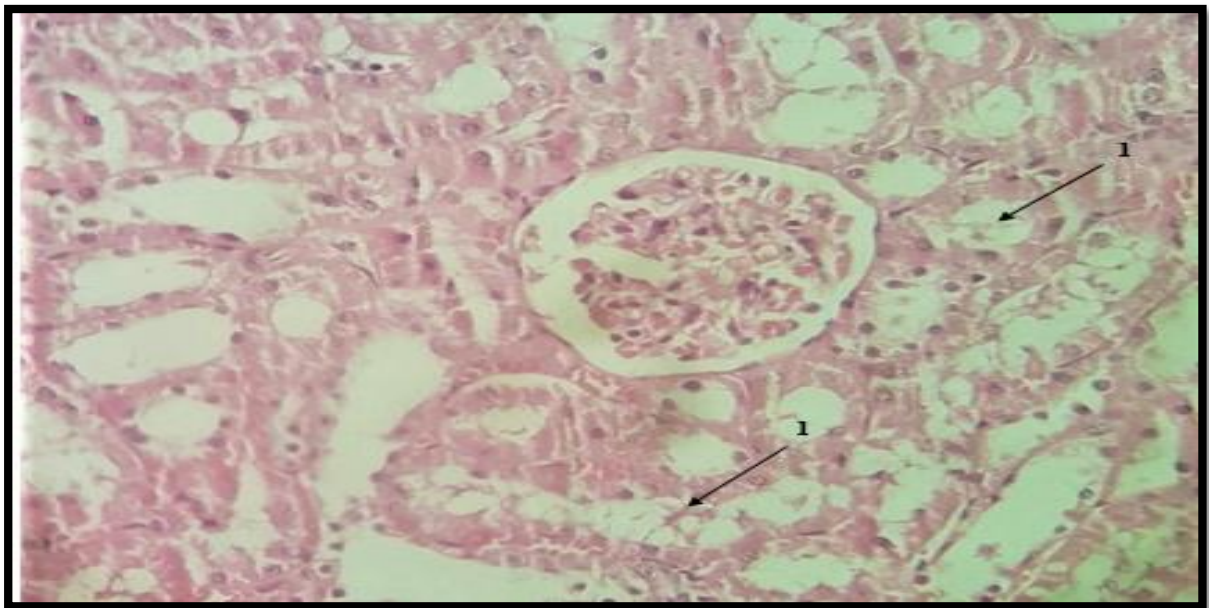


Image 08: Photomicrographie histologique du rein d'un rat traité avec la vitamine E à la dose 100 mg/kg (X400).

1: Architecture normale des glomérules avec dilatation tubulaire.

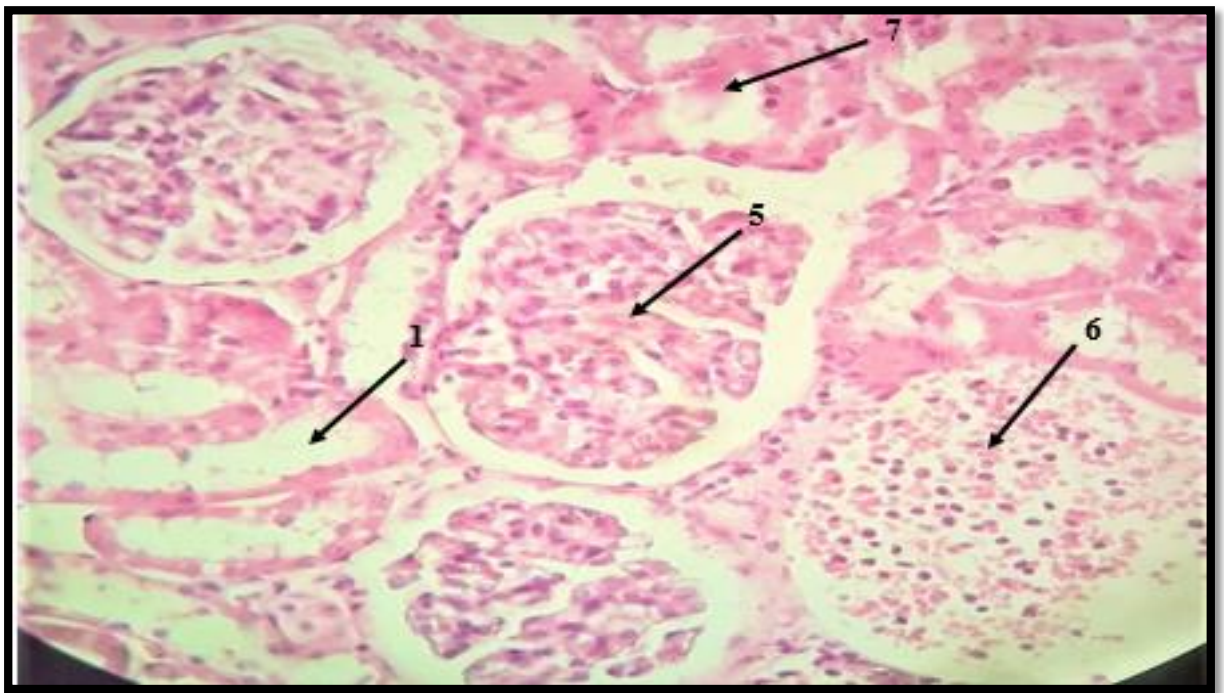
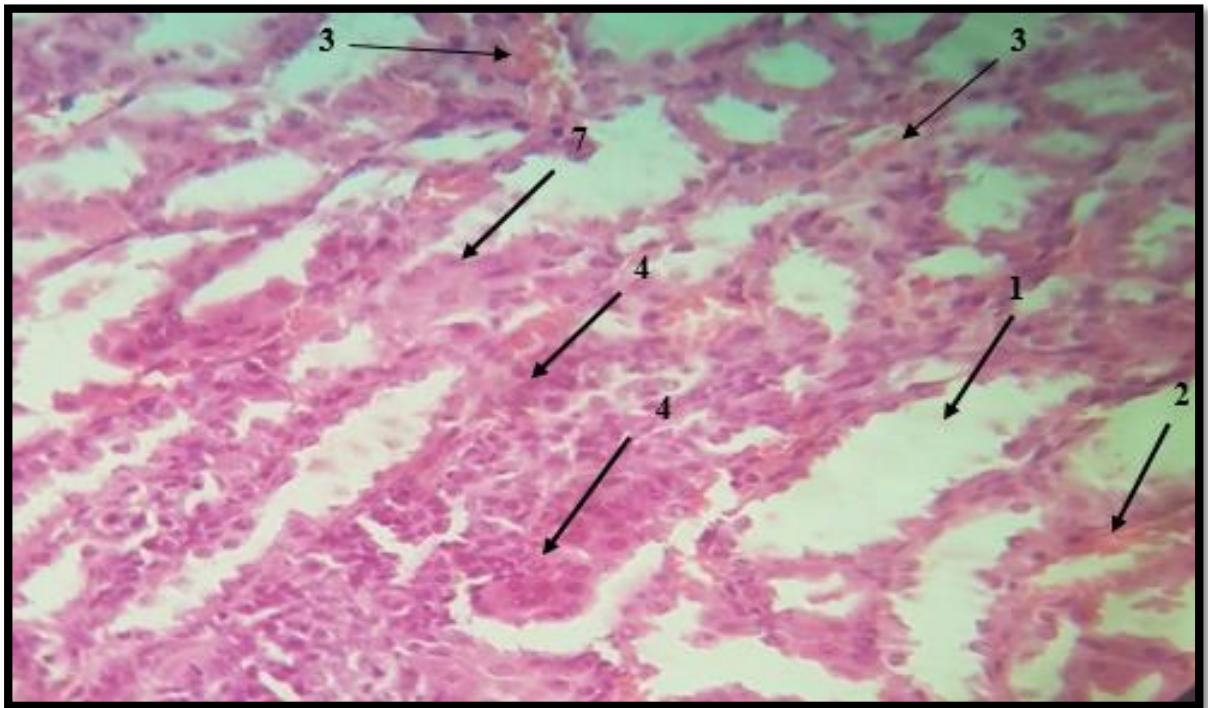


Image 09: Photomicrographies histologiques du rein d'un rat traité avec le PCP à la dose 20 mg/kg (X400).

1 : Dilatation tubulaires, 2 : Nécrose tubulaire, 3 : Congestion interstitielle, 4 : Nécrose interstitielle, 5 : Congestion glomérulaire, 6 : Nécrose glomérulaire, 7 : Œdème.

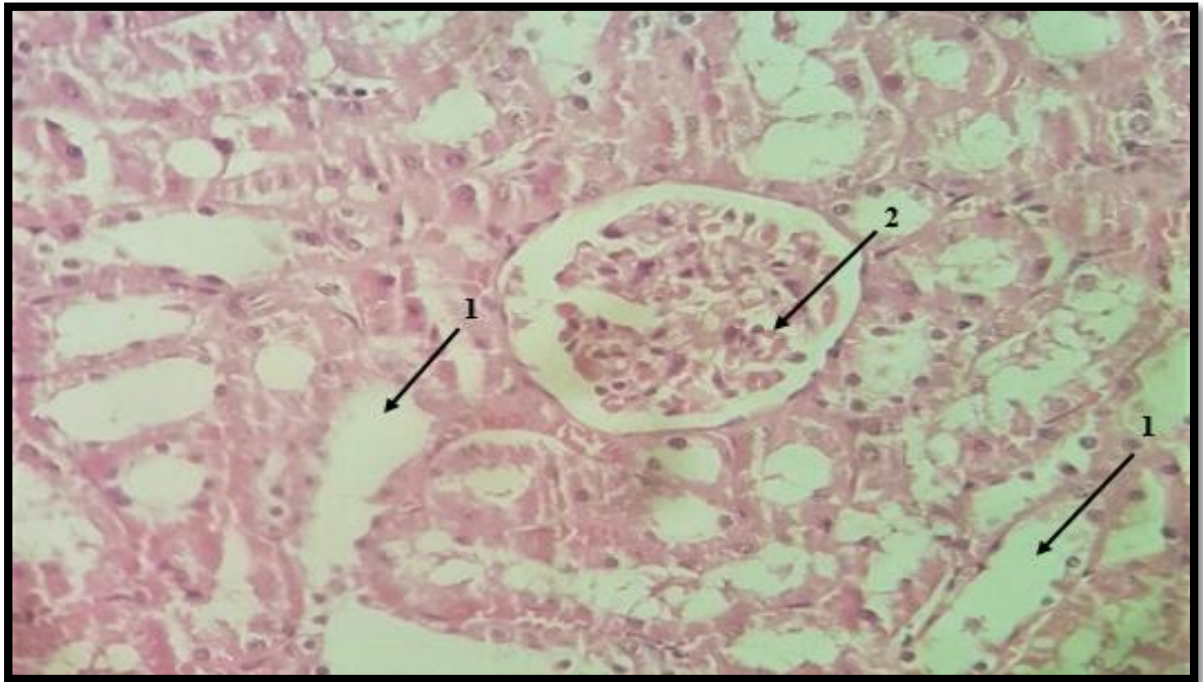


Image 10: Photomicrographie histologique du rein d'un rat traité avec l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* à la dose 50 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400).

1 : Dilatation tubulaire, 2 : Peu de congestion glomérulaire.

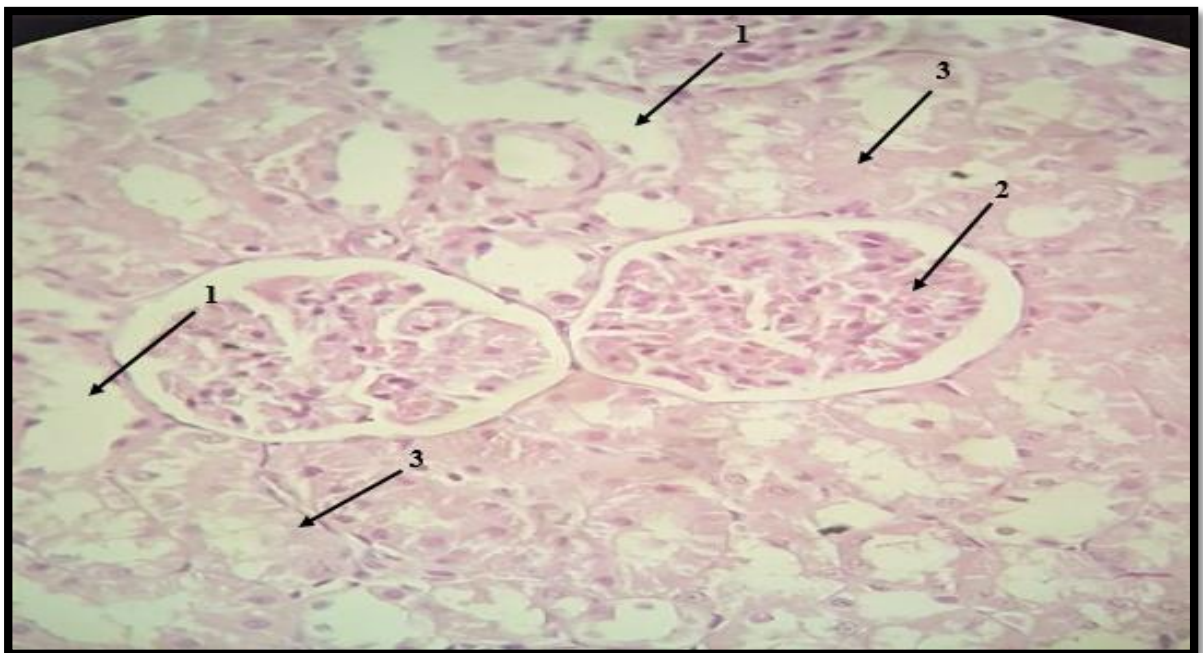


Image 11: Photomicrographie histologique du rein d'un rat traité avec l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* à la dose 100 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400).

1 : Légère dilatation tubulaire, 2 : Moins de congestion glomérulaire, 3 : Œdème.

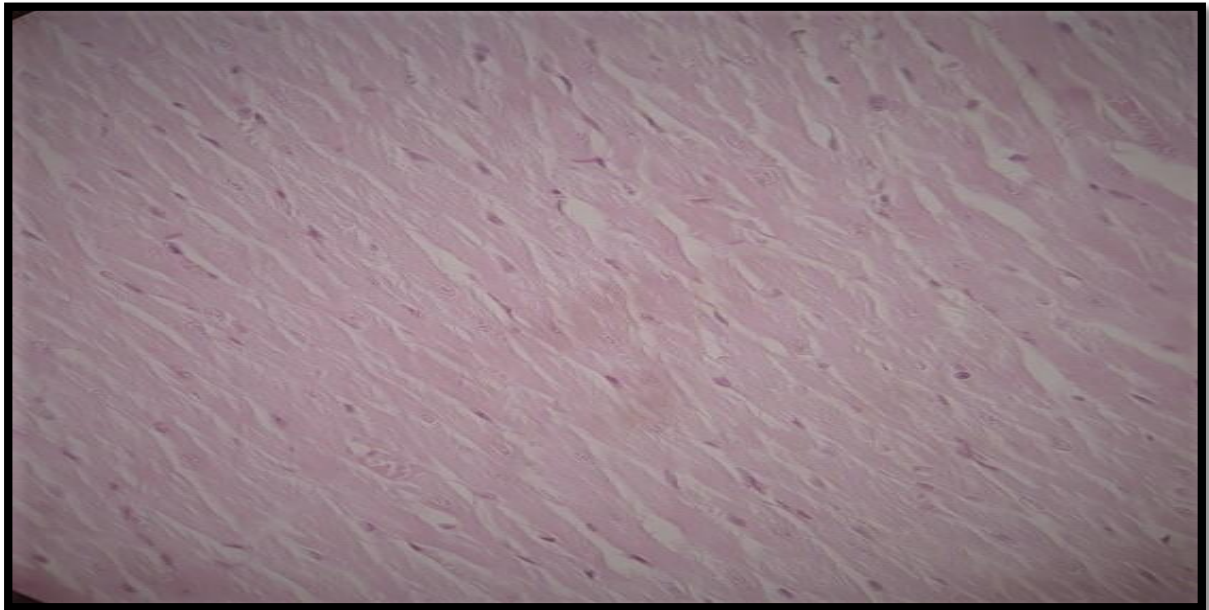


Image 12: Photomicrographie histologique du cœur d'un rat témoin (X400).

Architecture normale avec des Faisceaux de fibres musculaire stries.

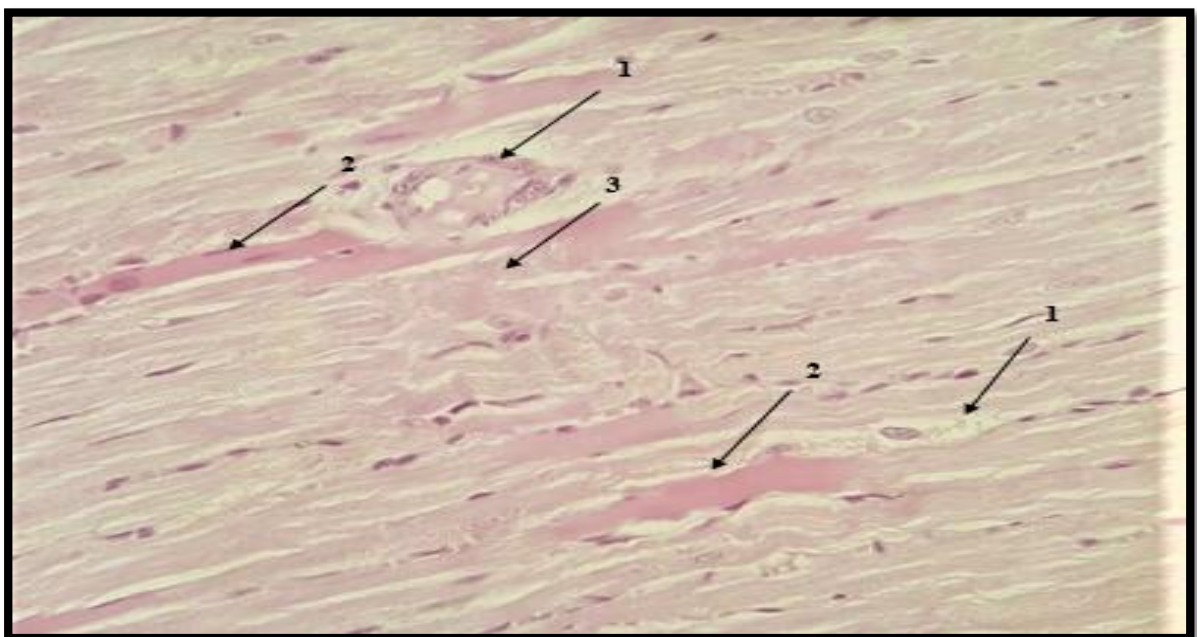


Image 13: Photomicrographie histologique du cœur d'un rat traité avec le PCP à la dose 20 mg/kg (X400).

1 : Congestion, 2 : Nécrose, 3 : Œdème.

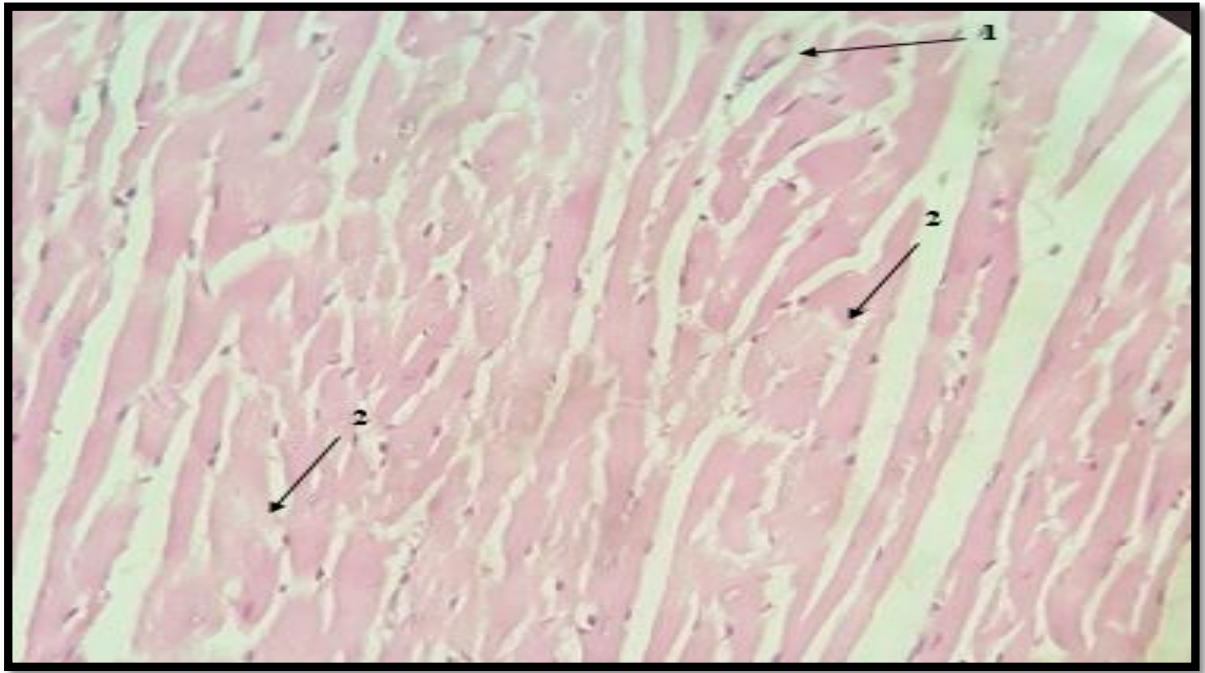


Image 14: Photomicrographie histologique du cœur d'un rat traité avec l'extrait *n*-butanol de *P. coronopifolia* à la dose 50 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400).

1 : Moins de congestion, 2 : Œdème.

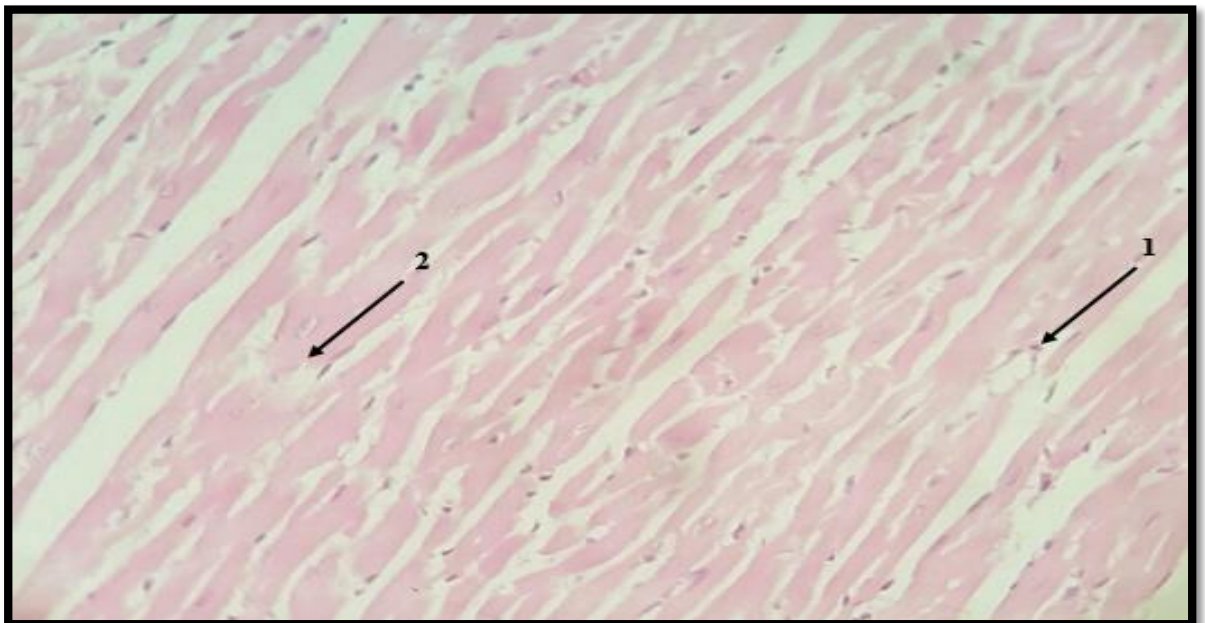


Image 13: Photomicrographie histologique du rein d'un rat traité avec l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* à la dose 100 mg/kg et le PCP à la dose 20 mg/kg (X400).

1 : Moins de congestion, 2 : Œdème.



4- Discussion

Discussion des résultats *in vitro* et *in vivo* : les effets protecteurs des deux plantes *P. coronopifolia* et *G. reboudiana*

L'utilisation d'antioxydants naturels, qui peuvent supprimer les dommages oxydatifs, peut être bénéfique dans la prévention des maladies. Les mécanismes d'action antioxydante comprennent la suppression de la formation de EROs, soit par l'inhibition des enzymes, soit par la chélation des oligo-éléments impliqués dans la production de radicaux libres, le piégeage des espèces réactives et la régulation ou la protection des défenses antioxydantes.

Cette étude a été conçue pour évaluer *in vitro* la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes, l'activité anti-oxydante, la protection oxydative contre les dommages d'ADN et l'activité anticancéreuse des extraits éthyle d'acétate (EtOAc-PC) et *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) de la plante *P. coronopifolia* et l'extrait méthanolique (MeOH-GR) de la plante *G. reboudiana*. Les propriétés antioxydantes *in vivo* de l'extrait *n*-BuOH-PC et de l'extrait MeOH-GR ont été étudiées en fonction de son effet hépato-protecteur, réno-protecteur et cardio-protecteur chez des rattes femelles (Albinos Wistar) contre la toxicité induite par le PCP (pentachlorophénol). Un examen histologique a été achevé à fin de soutenir les précédentes études.

Dans la présente étude, La teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC ainsi que de l'extrait MeOH-GR a été mesurée comme décrit dans Matériels et Méthodes, avec une méthode couramment utilisée pour caractériser des échantillons botaniques et estimer la teneur totale en composés phénoliques dans les fruits, les légumes et les extraits de plantes. ces extraits ont montrés une grande teneur en ces composés. Le rôle fondamental du contenu phénolique comme piègeur de radicaux libres est souligné dans de nombreuses études (Amrani et al, 2017a ; Ali Demirci et al., 2018). Les composés flavonoïdes sont les éléments végétaux les plus essentiels du fait de leurs groupes OH qui peuvent offrir la capacité antioxydante (Kumar et al., 2008).

Dans la présente étude, les distincts extraits ont montré une activité antioxydante totale élevée, comparée à celles de la vitamine C et le BHA. L'activité antioxydante est principalement réalisée comme un index pour les substances thérapeutiques bioactives et fonctionnelles dans les nutriments. L'activité antioxydante des extraits est le résultat de l'existence de polyphénols et de flavonoïdes, qui peuvent éventuellement agir en offrant des électrons et des radicaux libres. Des résultats similaires ont été obtenus par Barros et al. (2007) et Ozen et al. (2011) dans leurs études

sur des extraits déférents. Ils ont démontré que les composés flavonoïdes ont une puissante activité antioxydante.

Les extraits montrent qu'ils peuvent agir comme des terminateurs de chaîne radicalaire qui convertit les radicaux libres réactifs en produits stables et non réactifs. Ceci est à l'origine de leurs capacités à prévenir les réactions en chaîne de peroxydation lipidique. De plus, il a été rapporté que les teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes sont liées à la capacité antioxydante et jouent un rôle nécessaire dans la stabilisation de la peroxydation lipidique (Koldaş et al., 2015).

Afin de témoigner les effets antioxydants de nos extraits, la présente étude est focalisée sur plusieurs méthodes complaisantes le pouvoir anti-radicalaire de ces extraits. Le pouvoir réducteur montré par nos extraits peut être un indicateur significatif important de leurs capacités antioxydantes potentielles. Les résultats ont montré que la couleur jaune de la solution d'essai change en diverses nuances de vert et de bleu en fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon d'essai, tel qu'étudié par la méthode de réduction du ferricyanure de potassium. C'est le résultat de la réduction du complexe Fe^{+3} -ferricyanure en Fe^{+2} . Par conséquent, Fe^{+2} peut être vérifié en déterminant la création du bleu de Prussain de Perl à 700 nm (Apak et al, 2016 ; Ozen et al 20017a).

La littérature a rapporté que la capacité réductrice des produits est communément liée à l'existence de réducteurs comme les constituants antioxydants (Özen, 2010). La grande capacité réductrice de nos extraits et spécialement les extraits de la plante *P. coronopifolia* (EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC) peut être le résultat de leurs quantités efficaces de phénols et de flavonoïdes. Des relations similaires concernant la capacité réductrice de Fe^{+3} et les polyphénols ont été déclarées dans la littérature (Kada et al., 2017 ; Ali Demirci et al., 2018).

D'autre part, l'effet des extraits sur le piégeage de H_2O_2 est très important, ce qui prouve fortement que les extraits contiennent les substances nécessaires pour l'élimination radicalaire. En conséquence, la capacité de piégeage de ces extraits des deux plantes contre les radicaux d'hydroxyle résulte directement en inhibant la progression du système de peroxydation des lipides. Le peroxyde d'hydrogène est très essentiel en raison de sa facilité à traverser les biomembranes. Il n'est pas dangereux par lui-même, mais peut très bien être à cause de sa capacité à former des radicaux hydroxyles et être toxique pour les cellules, soulignant ainsi la nécessité de son élimination. En effet, il a déjà été suggéré que les polyphénols diététiques empêchent les cellules mammaliennes et bactériennes contre la cytotoxicité du peroxyde d'hydrogène (Nakayama, 1994).

De toute évidence, la capacité de nos échantillons à piéger le peroxyde d'hydrogène pourrait être due à la présence de composés flavonoïdes et de phénols. Des études similaires indiquent que l'élimination du peroxyde d'hydrogène est très nécessaire pour la prévention du processus vivant (Koldaş et al., 2015).

Le radical libre DPPH[·] reçoit un électron ou un hydrogène pour être un élément diamagnétique stable. Les résultats des potentiels de piégeage des radicaux libres des extraits et de l'acide ascorbique ont été mesurés par la méthode DPPH[·] à différentes concentrations. Le degré de décoloration du violet au jaune indique les potentiels de piégeage de nos extraits. Il réagit avec l'antioxydant et se transforme en DPPH₂ 1,1-diphényl-2-picryl hydrazine, en raison de sa capacité d'offre d'hydrogène. Par conséquent, le test de DPPH[·] est couramment utilisé comme paramètre pour évaluer les capacités antioxydantes des antioxydants naturels. Les résultats indiquent que l'activité de piégeage des radicaux libres a également augmenté avec l'augmentation des concentrations d'extraits.

Nos données ont clairement indiqué que les distincts extraits ont une activité inhibitrice des radicaux libres. Mais, les extraits de la plante *P. coronopifolia* (EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC) ont une puissance de piéger les radicaux libres souvent supérieurs à celle de l'extrait métanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR). Ce résultat peut être remarquable par rapport à l'étude de Boussaha et al., 2015, qui témoigne que cette capacité antioxydante est associée à l'existence de composés flavonoïdes comme la taxifoline, la rhamnazine et les dérivés de l'acide caféoylquinique déterminés dans cette plante. Une étude récente a suggéré que cette activité anti-radicalaire très puissante contre le radical DPPH[·] de la plante *P. coronopifolia* est pourrait s'expliquer par les grandes quantités de certains composants majeurs comme γ -eudesmol, α eudesmol et *cis*-nérolidol identifiés dans les huiles essentielles de parties aériennes de cette plante (Hamdouch et al., 2017).

Dans cette étude, l'activité chélatante de Fe⁺² des extraits a été évaluée par le dosage de la ferrozine. La ferrozine peut former un complexe ferrozine-Fe⁺², efficacement. Ce complexe est perturbé par des composés chélatants. Par conséquent, la couleur rouge du complexe disparaît progressivement. Le degré de réduction de la couleur rouge convient de prédire le niveau de la capacité de chélation des métaux du chélateur existant (Ozen et al, 2017a). Dans la présente étude, les extraits et les antioxydants standards ont interféré avec la formation du complexe ferrozine-Fe⁺², suggérant qu'ils ont une capacité de chélation en capturant le Fe⁺² plus tôt que la ferrozine.

La formation du complexe ferrozine-Fe⁺² est perturbée en présence des extraits qui indique qu'ils chélatent le fer. La capacité de chélation des métaux par les trois extraits a été augmentée

en augmentant la concentration. Il a été indiqué que les composés chélatants formants des bandes avec un métal sont de plus faibles antioxydants en raison de la réduction du potentiel rédox. Ainsi, le fer peut provoquer une peroxydation lipidique par réaction de Fenton, ce qui peut l'accélérer par décomposition des hydroperoxydes lipidiques en radicaux peroxy ($LO_2\cdot$) et alcoxy ($LO\cdot$) qui peuvent capter l'hydrogène et propager la formation de la peroxydation lipidique (Ayala et al. 2014).

La présente étude a suggéré que les différents extraits ont des composés chimiques très actifs donnant des propriétés antioxydantes très efficaces, comme le montre le test de piégeage de radicale $OH\cdot$. Les trois extraits ont présenté un pouvoir anti-radicalaire très puissant vis-à-vis ce radical. Celui-là est plus élevé en comparant à celui obtenu avec la vitamine C dans les mêmes conditions.

En plus, la peroxydation lipidique est une réaction en chaîne initiée par l'extraction d'hydrogène ou l'addition d'un radical oxygène, entraînant l'endommagement oxydatif des acides gras polyinsaturés. Les produits résultants de la peroxydation lipidique induite par les ERO ont des conséquences très néfastes sur les enzymes et les récepteurs membranaires, dont le MDA. Ce produit est considéré comme le composé terminal le plus effectuant de processus membranaire (Yin et al., 2011).

Afin de confirmer les effets protecteurs des extraits contre la peroxydation lipidique, un autre test a été utilisé dans cette étude. C'est le test de l'inhibition de la peroxydation lipidique non enzymatique. Les trois extraits ont montré un effet inhibiteur remarquable de cette dernière. Donc, les extraits inhibaient la peroxydation en réduisant la propagation du MDA, reflétant ainsi les caractéristiques typiques d'un antioxydant qui casse la chaîne, similaire à l'antioxydant standard (la vitamine C).

Aussi bien, les EROs sont connus pour avoir de nombreux effets dommageables sur les cellules du corps. Ils induisent gravement des lésions dans l'ADN sous forme de délétions, de mutations et d'effets génétiques. Les produits naturels dans les plantes médicinales peuvent piéger les ERO générés par la rupture du stress oxydatif (Guha et al., 2011). Diverses études suggèrent que certains extraits de plantes peuvent protéger l'ADN contre les dommages oxydatifs par leurs composés antioxydants (Arora et al., 2017). Selon les rapports, les extraits de certaines plantes étaient pratiques pour empêcher l'ADN de la lésion oxydative induite par la photolyse aux UV de H_2O_2 (Lassed et al., 2015).

Par une autre voie, l'étude actuelle était basée sur la capacité des trois extraits (EtOAc-PC, *n*-BuOH-PC et MeOH-GR) à protéger l'ADN plasmidique 46966 contre la photolyse UV de l'oxydation induite par H₂O₂. L'exposition du plasmide à la photolyse UV de H₂O₂ entraîne la production de radicaux hydroxyles (OH[·]). Ces radicaux sont connus pour provoquer la rupture oxydative des brins d'ADN, la fragmentation des désoxyribonucléaires, la modification des bases, l'oxydation des lipides et la génération de produits finaux comme les MDA et les aldéhydes insaturés, qui peuvent s'accorder avec l'ADN et entraîner des adduits mutagènes (Chaudhary et al., 1994).

Le résultat électro-phorétique de l'ADN plasmidique 46966 ont prouvé que les extraits EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC présentent une protection complète de l'ADN plasmidique. Ce qui indique que les dommages de l'ADN plasmidique sont causés par les radicaux hydroxyles. Le post-traitement avec ces extraits et même par l'extrait MeOH-GR protège l'ADN plasmidique des radicaux hydroxyles générés par la photolyse UV de l'H₂O₂.

Cette étude montre une corrélation notable entre le potentiel antioxydant et le pouvoir de piégeage de l'hydroxyle radical d'une part, et la protection de l'ADN de l'autre part. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la perte d'ADN par les différents extraits soit de plante *P. coronopifolia* ou de la plante *G. reboudiana* pourrait être due à la grande capacité antioxydante de ces extraits révélée par le niveau cumulatif de l'activité antioxydante, la puissance réductrice, la capacité de piégeage de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de radical hydroxyle (OH[·]), la chélation des métaux et le pouvoir puissant d'inhiber la peroxydation lipidique. En conséquence, nos extraits peuvent être des agents puissants qui fournissent une protection totale de l'ADN.

Simultanément, Les activités antiprolifératives sont largement étudiées sur des plantes médicinales et d'autres sources ordinaires (Demirtas et al., 2009 ; Yaglıoglu et al., 2013).

Les cellules HeLa et C6 ont été inactivées par les deux extraits de la plante *P. coronopifolia* et ont montré une activité maximale à des concentrations élevées. L'activité anticancéreuse en concentration plus élevée pourrait être due aux profils chimiques comme la haute conception de contenu polyphénolique et flavonoïde. Les travaux phytochimiques menés sur ces extraits ont permis l'isolement et l'identification structurale de plusieurs types de métabolites secondaires. Ainsi que l'analyse HPLC a mis en évidence la présence de plusieurs acides phénoliques dans les extraits de la partie aérienne de la plante *P. coronopifolia* (Boussaha et al., 2015).

L'activité puissante de la concentration plus élevée pourrait être due aux profils chimiques comme la haute conception de contenu des polyphénols et des flavonoïdes. Tandis que la

diminution de cette capacité pourrait être causée par le faible rapport molécule bioactif dans l'extrait végétal qui s'est dégradé dans le temps, les cellules peuvent croître après inactivation. Ces résultats sont concordent avec d'autres études qui suggèrent que certains extraits de plants qui ont un pouvoir antioxydant, sont aussi des puissants inhibiteurs de la prolifération des lignées cellulaires HeLa et C6 à des concentrations élevées (Azzouzi, 2017 ; Lassed et al., 2017 ; Ozen et al, 2017a ; Agina et al., 2018).

Cependant, l'extrait MeOH-GR a perdu pratiquement son capacité d'inhibition sur la prolifération cellulaire des lignées étudiées en quelques heures après son injection. Ce qui monte qu'il n'a pas une activité inhibitrice contre les lignées cellulaires cancéreuses par rapport au 5-FU, malgré son teneur est convenablement importante en polyphénols et flavonoïdes. Ceci peut être dû au faible rapport des biomolécules bioactives dans cet extrait, puis à la capacité de prolifération de ces cellules après quelques heures de blocage. Différentes études ont suggéré que ceci peut être dû aussi à la non coïncidence entre la structure des flavonoïdes présents dans quelques extraits et celle de flavonoïdes qui exècrent des propriétés antiproliférative (Batra et Sharma, 2013 ; Sak, 2014).

Une étude très récente suggère que la faible activité de certains extraits pourrait s'expliquer par la glycolisation de ces flavonoïdes qui peut empêcher leur accès dans les cellules cancéreuses. Les flavonoïdes peuvent être cytotoxiques, mais cette action dépend soit de leur glycolisation et leur degré de méthylation ou de leur concentration et du type de cellule traitée (Azzozi, 2017).

Afin d'affirmer les propriétés antiprolifératives de nos extraits contre les lignées cellulaires C6 et HeLa, le test ELISA de prolifération cellulaire BrdU a été effectué. Ce test a montré que plus encore la dose est élevée plus que l'effet antiprolifératif est augmenté (en fonction de la dose dépendante). Les activités supérieures ont été observées contre les lignées cellulaires C6 à des concentrations plus élevées (par rapport au 5-FU), mais les mêmes observations n'ont pas été obtenues contre les lignées cellulaires HeLa.

Les activités antiprolifératives des extraits EtOAc-PC et MeOH-GR ainsi que de 5-FU ont bien indiqué que ce sont les lignées C6 les plus actives et que l'extrait EtOAc-PC présente des activités supérieures contre les lignées cellulaires C6. Ces différences des activités antiprolifératives entre les extraits dépendent de leur composition phytochimique, de la nature et la concentration de leurs composés phénoliques et composés bioactifs, de degré de l'activité des cellules anticancéreuse et le pouvoir résistant de ces cellules contre certains agents anticancéreux.

Le lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique stable présente dans toutes les cellules. Il est rapidement libéré dans le surnageant de la culture cellulaire ou dans le sang lorsque la membrane plasmique des cellules est endommagée. Pour cette raison, le test LDH est un test largement utilisé comme test quantitatif de la toxicité de divers médicaments et molécules cellulaires (Kumar et al., 2014).

D'autre part, les extraits EtOAc-PC et MeOH-GR ne montrent pas des effets cytotoxiques par rapport au 5-Flu. Ce qui certifie que l'extrait EtOAc-PC exerce un effet anticancéreux et antiprolifératif contre les cellules C6 et HeLa sans aucun effet cytotoxique observé par le test de fuite du lactate déshydrogénase (LDH).

Les xénobiotiques tels que les pesticides ont été capables de produire des EROs, qui provoquent parfois le stress oxydatif dans divers tissus (McDonough, 2003 ; Rai et al., 2007 ; Mehta et al., 2009). La richesse en phénols et en flavonoïde, le potentiel antioxydant et la capacité d'inhiber les dommages oxydatifs tels que les atteintes d'ADN et la peroxydation lipidique, sont les facteurs principales qu'on nous encourage de mettre en évidence la capacité antioxydante *in vivo* de ces extraits et chercher le pouvoir protecteur de ces extraits contre les intoxications induites par les xénobiotiques, particulièrement par le PCP.

Plusieurs méthodes complémentaires *in vivo* ont été réalisées dans cette étude. Ces méthodes ont permis d'évaluer l'effet protecteur de l'extrait au *n*-butanol de *P. coronopifolia* et l'extrait métanolique de la plante *G. reboudiana* sur le maintien du système antioxydant contre les xénobiotiques. Cet effet a été démontré par des expériences sur des animaux en induisant une intoxication aiguë chez des rattes adultes par le PCP.

L'ingestion du PCP pendant deux semaines avec une dose de 20 mg / kg a provoqué des altérations fonctionnelles très importantes au niveau des foies, des reins et des cœurs des rattes. Ce dysfonctionnement de ces organes est mis en évidence par l'augmentation significative du taux de MDA, l'un des principaux produits résultant de la peroxydation des lipides, par la diminution de l'activité des enzymes antioxydantes telles que la GPx et par la diminution des taux de GSH dans les homogénats de ces organes par rapport aux ceux du groupes témoins.

Dans ces expériences, l'administration du PCP (20 mg / kg pendant 15 jours) a induit une augmentation des EROs suite à un trouble de stress chez les rats. Un trouble aigu du foie, du rein et du cœur et des modifications sévère dans ces organes. Des études antérieures ont montré que les pesticides et surtout le PCP augmentaient les taux de MDA dans divers tissus de rats par rapport aux modèles sains (Dong et al., 2009 ; Han et al., 2009 ; Angela et al, 2012 ; Zhou et al., 2013).

Les dommages dus à l'utilisation de pesticides ont persuadé la peroxydation lipidique fréquemment bien connue et extra-évaluée dans des essais expérimentaux pour comprendre les mécanismes cellulaires de la lésion oxydative et estimer le potentiel bénéfique des remèdes et des antioxydants diététiques (Zhou et al., 2013).

Le stress oxydatif dans les trois organes a été aggravé par le PCP depuis une diminution significative des niveaux de GSH. La réduction de GSH favorise la formation des EROs et de stress oxydatif avec une cascade de changements dans l'état structurel et éventuellement fonctionnel des cellules et des organelles membranaires.

Le rôle principal de GPx est la réduction du peroxyde d'hydrogène soluble et des peroxydes d'alkyle et la décomposition de H_2O_2 en eau, en utilisant le GSH comme substrat (Bebe et Panemangalore, 2003). La réduction de ce substrat est liée à une inhibition de l'action GPx. Ce GSH réduit, en plus de GPx et GST (glutathion-S-transférase) est responsable des cycles redox du GSH qui maintiennent le statut redox des tissus contre la destruction oxydative persuadé par les ERO et protègent également leurs protéines structurales et régulatrices. Les radicaux libres sont compliqués dans les troubles oxydatifs en encourageant une atteinte hépatique, rénale et cardiaque par le PCP, comme le prouve la réduction significative des activités de la GPx.

D'autre part, des recherches précédentes ont rapporté que les quinones et les semiquinones (produits du métabolisme du PCP) sont électrophiles et peuvent être fixées avec des macromolécules dans les cellules. Cela pourrait perturber la membrane plasmique et augmenter sa perméabilité et provoquer la lésion du système électrique (Shan et al., 2013). Cela conduit à la production d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène à un taux très élevé qui augmente les dommages oxydatifs. Cela pourrait bien induire des changements dans les enzymes impliquées dans la phosphorylation oxydative (Zhou et al., 2013).

De plus, la réduction du niveau de peroxydation lipidique dans les groupes traités avec des extraits pourrait être due à l'augmentation du statut antioxydant, entraînant une augmentation de l'activité de la GPx et de la concentration du GSH par rapport au groupe témoin. Il a été signalé que si les activités CAT et GSH ne sont pas suffisamment amplifiées pour métaboliser le peroxyde d'hydrogène, cela peut entraîner une augmentation des niveaux de peroxyde d'hydrogène et de TBARS et perturber le rôle typique des cellules.

Les résultats obtenus chez les rats traités avec ces extraits sans induction du stress oxydatif indiquent que ces extraits peuvent améliorer la ligne de base du mécanisme de défense contre le stress oxydatif possible, diminuant ainsi la susceptibilité aux maladies liées au stress oxydant telles que les maladies cardiovasculaires, hépatiques et rénales.

Cependant, le prétraitement avec l'extrait *n*-BuOH-PC et l'extrait MeOH-GR ainsi qu'avec la vitamine E (avant l'induction de stress oxydatif) diminue la concentration du MDA, indiquant leur effet anti-lipoperoxydant en raison de leurs capacités antioxydantes et anti-radicalaires puissantes, et donc une restauration bio-membranaire de cellules du parenchyme hépatique avec une prévention de la fonction rénale et cardiaque. De plus, Le prétraitement avec ces extraits a normalisé le taux du glutathion et l'activité du GPx dans des différents tissus, ce qui peut être due à la synthèse *de novo* et / ou à la régénération du GSH via l'activation de la glutathion réductase et l'inhibition de la formation de radicaux libres (Nasir et al., 2013 ; Agina et al., 2018). Ces conséquences qualifient l'importance biologique de ces extraits dont la prévention du cycle de redox du glutathion et aussi la purification directe des EROs.

Des nombreuses études ont montré qu'après l'administration d'aliments riches en polyphénols, le niveau de stress oxydant et l'amélioration du statut antioxydant étaient principalement fondés sur la réduction des niveaux de TBARS et l'inhibition de la formation des EROs (Boaventura et al., 2013). En conséquence, l'effet antioxydant observé peut être due à l'action synergique de composés bioactifs présents dans ces extraits et à la forte teneur en polyphénols, soulignant l'influence de ces antioxydants dans l'alimentation sur la santé humaine.

La dysfonction hépatique induite par le PCP est révélée par une augmentation significative du taux d'AST, d'ALT et des bilirubines totales, que sont des signes biochimiques d'atteinte hépatique.

Des enzymes ALT accrues étaient dues à la destruction de la structure hépatique. A partir du moment où cette enzyme est contenue dans le cytoplasme, elle sera déplacée vers la circulation sanguine après un changement cellulaire provoquant l'augmentation de sa concentration. Alors que, l'augmentation de concentration des enzymes AST a indiqué que l'administration du PCP à des rattes provoque des dommages à la fois dans les membranes plasmiques et d'organelles, ce qui est complété par l'ajustement structurel et fonctionnel des mitochondries. Ce résultat est confirmé par d'autres résultats (Nishimura et al., 1980, Villena et al., 1992).

La bilirubine est une molécule produite durant la dégradation de l'hémoglobine (dégradation des globules rouges). Elle est d'abord dite libre non soluble dans l'eau, elle est transportée par

l'albumine et gagne le foie où elle est conjuguée avec des groupements lipidiques et prend le nom de conjuguée. Elle est éliminée dans les selles. Les études subaiguës et chroniques réalisées chez les rats recevant de PCP ont montré que leurs excréments sont très accrues de porphyrine, molécules précurseurs de l'hème. (Fleischer, 1980 ; Wainstock et Martin, 1980). C'est le résultat d'une destruction de l'hémoglobine, un stockage de l'hème et par conséquent une production de La bilirubine. Selon l'étude de Pico et al., 2006, les pesticides sont capables de se lier avec les hémoglobines et essentiellement avec l'albumine. Les pesticides diminuent la production des albumines (Singh et Singh, 2014). Donc, l'augmentation du taux de bilirubines totaux suite à l'ingestion du PCP est le résultat d'une dégradation de l'hémoglobine, d'une diminution de la production de l'albumine et en fin d'une liaison de PCP avec l'albumine lui-même en réduisant son rôle transporteur (forme libre) de la bilirubine.

En outre, La créatinine est l'un des matériaux de déchets, de la décomposition des protéines dans le corps, filtrée au niveau du glomérule rénale et excrétée dans l'urine. Le glomérule est sensible à la créatinine accumulée plus dans la circulation sanguine et sera incapables de le supprimer. Cela reflète fidèlement l'insuffisance rénale. Mais, il est pris en compte avec l'évacuation de l'urée sanguine, molécules provient aussi de la dégradation des protéines. Le taux d'urée dépend à la fois de la fonction rénale, des apports alimentaires protéiques, de la destruction des protéines de l'organisme.

L'examen biochimique dans les sérums de ces rats recevant le PCP a révélé une augmentation des niveaux de l'urée et des créatinines chez ces derniers indiquant la dégradation protéique et par conséquent le dysfonctionnement rénal. D'autre part, le prétraitement des rattes avec extraits montre qu'ils sont également capables de réduire les concentrations de l'urée et de créatinine, dans le sérum de rats empoisonnés par le PCP.

Ainsi, la normalisation des niveaux d'ALT, d'AST, de bilirubines totales, d'urée et de la créatinine sériques suggère la stabilisation du réticulum endoplasmique par le prétraitement avec ces extraits, conduisant à la synthèse de protéines dans le foie. La stimulation de la synthèse des protéines a été avancée en tant que mécanisme de protection contribuant à accélérer la régénération des cellules. Cette étude suggère un effet hépato et néphroprotecteur de ces extraits contre la toxicité aiguë induite par le PCP.

En outre, la présente étude mentionne une augmentation significative des niveaux de cholestérol et de triglycérides dans le sérum du groupe PCP par rapport au groupe témoin. Cette constatation peut suggérer que l'administration de PCP a provoqué des changements dans le profil

lipidique, ce qui peut conduire à un gonflement des cellules hépatiques. La progression de la stéatose hépatique est en train de faire un mécanisme important qui augmente la source de substrat pour l'estérification des acides gras, motivé directement la voie d'estérification comme diminué aussi le transfert hépatique de triglycérides comme les lipoprotéines de très basse densité (vLDL). Alors que, dans le co-traitement avec les extraits des deux plantes ou avec la vitamine E, les taux de cholestérol et de triglycérides étaient significativement diminués dans le sérum, en raison de leur inhibition dominante de la peroxydation lipidique.

La dégradation lipidique, lipoprotéique et protéique marqué dans les différents homogénats et les sérums explique la perte de poids signalée au cours de la période de test.

Les observations histopathologiques des fragments hépatiques d'animaux non traités indiquaient une structure lobulaire hépatique typique et un arrangement cellulaire. Bien que celui du groupe traité avec le PCP ait révélé des lésions structurelles complètes. Cette constatation concorde avec les résultats d'Agha et al., 2013. D'autres études ont confirmé que les rats ayant exposé à une intoxication acérée par le PCP présentaient des modifications histologiques défavorables telles que : ballonnement, vacuolisation, dégénérescence et nécrose des cellules hépatiques, une fibrose péri-portale, une hypertrophie hépatique, etc. (Villena et al., 1992 ; ATSDR, 2001; Abhay et Sunanda, 2015).

Dans le cas de rats prétraités par l'extrait *n*-BuOH-PC, l'extrait MeOH-GR et par la vitamine E, une architecture hépatique normale a été observée avec un léger degré de dilatation de la veine centrolobulaire. Clairement, ces données indiquent l'effet protecteur offert par les deux extraits et la vitamine E en préservant les activités des enzymes antioxydantes et en inhibant la peroxydation des lipides chez les rattes. Ces conclusions concordent avec les résultats de (Villena et al., 1992 ; Agha et al., 2013).

L'atteinte rénale aiguë, caractérisée par une augmentation des taux sériques d'urée et de créatinine, était également accompagnée de modifications histo-pathologiques correspondantes, telles que la nécrose et la congestion interstitielle et glomérulaire, la nécrose et la dilatation tubulaire et l'œdème. Le PCP pouvait provoquer des lésions structurelles au niveau des reins chez le rat et que sa concentration et / ou sa durée d'exposition déterminaient le degré de ces lésions. Il est capable de perturber de manière significative la structure bicouche de deux phospholipides liés à la membrane (Suwalsky et al., 1990). Alors, Les dommages primaires sont localisés dans la barrière filtrante grâce à une réabsorption de quantités excessives de protéines provenant du filtrat glomérulaire (Villena et al., 1992 ; Abhay et Sunanda, 2015). Ces changements remarquables

montrent que le traitement avec le PCP altère la fonction et la structure des reins. En revanche, le prétraitement avec les extraits atténue les modifications histopathologiques dans les tissus rénaux, ce qui indique que ces extraits confèrent un effet protecteur.

L'atteinte de certaines cellules myocardiques a été caractérisée par une nécrose focale intéressante. La nécrose représente le mode de décès dominant induit par le PCP dans différents systèmes (Villena et al., 1992 ; Wang et al., 2000 ; Chen et al., 2004 ; Fernández et al., 2005 ; Agha et al., 2013 ; Abhay et Sunanda, 2015). Un stress oxydatif de forte intensité peut submerger le potentiel antioxydant et induire l'ouverture du pore de transition et de perméabilité mitochondriale. Une perméabilité non sélective de la membrane interne, pouvant conduire à la mort cellulaire nécrotique et apoptotique (Lushchak, 2011).

L'étude histologique de fragments des foies, reins et cœurs des rattes prétraitées par ces extraits a montré qu'il est capable de conserver l'architecture hépatique, rénale et cardiaque contre les dommages induits par le PCP. Cette capacité de protection et de conservation de tissus est peut être fournie par la grande composition de contenu polyphénolique et de flavonoïdes. De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols ont la capacité de réguler une diversité de processus cellulaires et moléculaires par interaction avec des cibles protéiques (protéines enzymatiques, protéines de signalisation intracellulaire, récepteurs nucléaires...) (Amiot et al., 2009).

Les polyphénols comprennent les acides phénoliques, sont riches en groupes hydroxyle phénoliques ayant des effets antioxydants en impliquant trois processus: le piégeage des radicaux libres, l'inhibition de la génération de radicaux libres et la peroxydation anti-lipidique (Kolac et al., 2017). Les acides phénoliques sont des composés anti-dommages du foie potentiels en protégeant les cellules hépatiques et préservant l'intégrité de la membrane lysosomale. Cette protection du foie peut être obtenue par les mécanismes suivants: élimination des radicaux libres, inhibition de la peroxydation lipidique, inhibition de l'expression des cytokines inflammatoires et amélioration de l'expression de la protéine membranaire 1 associée au lysosome (LAMP1) qui a été considérablement réduite par l'attaque de H₂O₂ (Yuan et al., 2015 ; Wang et al., 2019).

Certains acides phénoliques ont un effet protecteur contre des affections telles que l'ischémie de re-perfusion par ischémie myocardique en régulant le métabolisme de l'oxygène actif, en réduisant le stress oxydatif et l'apoptose du myocarde et par conséquent l'amélioration des changements ultra-structuraux du myocarde (Xue et al., 2014).

De plus, les données de cette étude ont confirmé que la vitamine E jouait un rôle considérable dans l'évolution de la toxicité hépatique aiguë et des dommages oxydatifs induits par le PCP chez

le rat. La vitamine E a la capacité d'inhiber la peroxydation lipidique, la dégénérescence hépatocellulaire, la nécrose, les lésions de l'ADN et les lésions de la matrice extracellulaire (Timbrell et al., 1995 ; Zhou et al., 1996 ; Agha et al., 2013).

Nos extraits ont montré *in vivo* qu'ils pouvaient agir en tant que terminateurs des chaînes radicales qui convertissent les radicaux libres réactifs en produits stables et non réactifs, ainsi qu'en tant que chimo-protecteurs contre les dommages oxydatifs induits au niveau des différentes cellules dans l'organisme après l'ingestion de PCP.

Dans notre étude *in vivo*, nous avons reconfirmé les résultats de l'étude expérimentale *in vitro*; qui a souligné que ces extraits ont un potentiel antioxydant important offert par leur haute conception de contenu polyphénolique et de flavonoïde, révélée par la capacité de piégeage des radicaux libres, la puissance d'inhibition de la peroxydation lipidique et le pouvoir de protéger l'ADN contre les dommages oxydatifs. En outre, ces résultats ont confirmé le rapport de l'activité anticancéreuse qui soutient que les extraits étudiés peuvent empêcher la propagation des lignées cellulaires HeLa (carcinome du col humain) et C6 (tumeur cérébrale de rat) à haute concentration sans conséquence cytotoxique détectée.

Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes d'action possibles de ces extraits de plantes vis-à-vis une toxicité induite par le PCP.



Conclusion générale

L'examen de plusieurs parties de plantes médicinales ressemblantes à des fruits, des légumes, des noix, des graines, des feuilles, des racines et de l'écorce, a reconnu pour déterminer leurs activités pharmacologiques et leurs possessions curatives. Sur cette base, nous assistons en regain de la phytothérapie et la détermination de la capacité antioxydante des extraits de ces plantes qui nécessite certaines approches analytiques.

Dans la présente étude les extraits de la plante *P. coronopifolia* (EtOAc-PC et *n*-BuOH-PC) et l'extrait metanolique de la plante *G. reboudiana* (MeOH-GR) montrent une richesse en composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes. Ces composés ont fourni un pouvoir antioxydant très important par rapport aux standards antioxydants. Ce pouvoir est justifié *in vitro* par la puissance réductrice, la grande capacité de piégeage des EROs, de chélation des métaux ainsi que d'inhibition de la peroxydation lipidique.

En effet, la conception importante en polyphénols a protégé l'ADN plasmidique contre les dommages oxydatifs induits par les EROs. Ainsi, une activité antiproliférative puissante de concentration plus élevée a été prouvée chez nos différents extraits, et spécialement chez les extraits de la plante *P. coronopifolia* examinés contre les lignes cellulaires cancéreuses C6 et HeLa.

De plus, plusieurs méthodes *in vivo* complaisantes le pouvoir antioxydant ont été effectuées. Ces méthodes ont prouvé que ces extraits ont un effet protecteur très important agit sur le maintien du système antioxydant contre les xénobiotiques. Cet effet a été démontré via une expérimentation animale *in vivo* en induisant une intoxication aigue chez des rattes adultes par le Pentachlorophénol (PCP).

En outre, l'administration du PCP pendant deux semaines avec une dose de 20 mg/kg a provoqué des altérations fonctionnelles très importantes au niveau des foies des reins et des cœurs des rattes. Le PCP a causé des lésions du système électrique dans les membranes des hépatocytes, des cellules rénales et myocardiques. Cette dysfonction est démontrée par l'augmentation significative du MDA, l'un des principaux produits résultants de la peroxydation lipidique. Ainsi que, l'examen des paramètres biochimiques dans le sérum de ces rattes a noté une augmentation des niveaux de transaminases AST et ALT ainsi que de bilirubines totaux indiquant la peroxydation lipidique au niveau des membranes des hépatocytes. Ces changements dans le profil lipidique ont prouvé pareillement par l'augmentation des niveaux de cholestérol et de triglycérides dans le sérum. Les concentrations de l'urée et la créatine ont montré une augmentation importante

indiquant une altération rénale sérieuse. Le PCP a provoqué une diminution de l'activité des enzymes antioxydant comme le GPx et une diminution du taux de GSH dans les trois organes ciblés.

D'autre part, les extraits étudiés ont montré qu'ils peuvent agir comme des terminateurs de chaîne radicalaire et convertissent les radicaux libres réactifs en produits stables et non réactifs, et aussi comme des chémo-protecteurs contre les dommages oxydatifs induits dans le foie, les reins et le cœur suite à une ingestion du PCP. Le prétraitement des rats avec nos extraits montre qu'ils sont capables de normaliser le taux du MDA et du glutathion réduit ainsi que l'activité de GPx dans les différents homogénats examinés. De plus, ils sont capables de diminuer les activités des transaminases AST et ALT, les concentrations de bilirubine totaux, de l'urée, de la créatine, de cholestérol et de triglycérides dans les sérums des rats intoxiqué par le PCP.

Suite à notre étude *in vitro* et *in vivo* qui montrent l'importance de l'effet antioxydant de ces extraits, l'étude histologique a montré leurs effets protecteurs contre les intoxications induites par le PCP, en protégeant l'architecture du foie, du rein et du cœur et en diminuant les altérations fonctionnelles et structurelles de ces organes.

Ces extraits ont bien montré un effet protecteur contre le déséquilibre lipidique, électrique et oxydatif, ainsi qu'un effet protecteur contre la toxicité induite par le PCP chez des rattes Wistar Albinos.

The protective effect of plant extracts (*Perralderia coronopifolia* and *Gaillonia reboudiana*) against toxicity caused by pentachlorophenol.

Introduction

Chemical control using pesticides remains the most used way to protect crops, seeds and stored commodities from pests. The use of pesticides has made significant progress in controlling pests, parasitic diseases and weeds in agriculture, in other words; against disturbing organisms. This type of product has provided a good assurance of food production.

In the early 1960s, many researches have shown that organochlorine pesticides have negative effects on various living organisms. They are very persistent in the environment especially in soils. They can bio-accumulate in trophic chains (Montano et al., 2013 ; Peng et al., 2017).

Among the most commonly used organochlorine pesticides is Pentachlorophenol (PCP). PCP is an artificial organochlorine substance, prepared from different chemical components. It is used for the manufacture of pesticides, fungicides, insecticides, antiparasitics and wood preservatives (Dong et al., 2009).

Oral, inhalation and dermal interaction, during a short or long contact period with PCP, in humans and experimental animals has shown distinct health effects. Recent studies have shown that exposure to PCP can lead to deterioration of endocrine function (Louise and Gerald, 1996; Benjamin et al., 2002), respiratory, hepatic, renal, reproductive and central nervous system (Morgan et al., 2015 ; Peng et al., 2017). PCP may also have difficulty with the immune system and thyroid homeostasis (Hurd et al., 2012 ; Yu et al., 2014).

The use of medicinal plants by humans is an ancient practice. Nowadays the majority of the inhabitants of the terrestrial globe use many plants, considering their aromatic properties, as remedy in traditional medicine. However, this use is not based on any scientific criterion, it simply takes into account observations over the centuries (Anderson, 2008 cited by Djebbari, 2017).

However, medicinal plants have potential antioxidant properties that can help prevent the formation of free radicals and various pathologies. Phenolic and polyphenolic compounds as well as flavonoids are the most important active compounds with these properties (Sedighi et al., 2017).

Several studies have analyzed the protective effect of different medicinal plants on pesticide-induced toxicity. In this context, many medicinal plants have been tested as antioxidants in order to control the potential of the potential harmful effect of free radicals and to reduce the damage caused by pesticides. By way of example, the protective effect of the *n*-butanol extract of the *Paronychia argentea* plant (Zama et al., 2007), the methanolic extract of the *Punica granatum*

plant (Agha et al., 2013), and the ethanolic extract of *Meconopsis integrifolia* (zhou et al., 2013). Therefore, there is a growing interest in the use of natural antioxidants as a protective strategy against liver, cardiovascular, renal and other problems. Animal experiments have suggested the antioxidant and protective effect of some plant extracts in PCP-induced toxicity attributed to the huge amount of polyphenols. The effects of plant extracts come from their composition in bioactive molecules such as polyphenols and flavonoids (Rawani et al., 2011, Agha et al., 2013).

Algeria is a Mediterranean country with a significant diversity of flora that contains up to 3000 species and 1000 genera (Bouabdelli et al., 2012). From this reason, we chose to evaluate the protective effect of the extracts of two endemic plants of Western Sahara against PCP-induced toxicity, which are *Perralderia coronopifolia* of the Asteraceae family and *Gaillonaia reboudiana* of the Rubiaceae family.

In this context, three studies were conducted in parallel:

The first part presents an experimental study *in vitro* and *in vivo* aimed at evaluating different properties of ethyl acetate extract and the *n*-butanol extract of the plant *Perralderia coronopifolia*.

The second part is an experimental *in vitro* and *in vivo* study aimed at evaluating the methanolic extract of the plant *Gaillonaia reboudiana*.

In these two parts, the *in vitro* study focuses on:

- ✓ An evaluation of polyphenols and flavonoids levels.
- ✓ An evaluation of the total antioxidant activity of the extracts, as well as the anti-radical activity of DPPH[•], hydroxyl radical and hydrogen peroxide.
- ✓ An evaluation of the reducing power, the metal chelating effect and the ability of extracts to inhibit the lipid peroxidation.
- ✓ An evaluation of the ability of extracts to protect DNA damage caused by UV photolysis of H₂O₂-induced oxidative damage.
- ✓ An evaluation of the antiproliferative power of the extracts against certain cancer cell lines by the use of the xCELLigence RTCA instrument and ELISA-BrdU cell proliferation assay.
- ✓ An evaluation of the cytotoxic effect of the extracts by the use of the lactate dehydrogenase leak test (LDH).

The *in vivo* study focuses on evaluating the protective effect of the *n*-butanol extract of *Perralderia coronopifolia* and the methanolic extract of *Gaillonaia reboudiana* against PCP-induced toxicity. We were interested in doing:

- ✓ An evaluation of the antioxidant power of extracts on lipid peroxidation, glutathione reserves and the activity of glutathione peroxidase.
- ✓ An evaluation of protective ability of extracts to modulate PCP-induced toxicity and oxidative damage in female rats.
- ✓ An evaluation of the effect of different treatments on biochemical parameters.

The third part is a histological study aimed to evaluate the protective effect of the *n*-butanol extract of *Perralderia coronopifolia* and the metanolic extract of *Gaillonaia reboudiana* with respect to the structural alterations of some organs in rats receiving the PCP. This study focuses on:

- ✓ A microscopic observation of the effect of PCP and various extracts on the structure of some organs (liver, kidneys and heart) using optical microscopy, using histological sections.

Bibliographic synthesis

I. Pesticides

Pesticides are organic or inorganic chemical compounds, natural or synthetic, with toxicological properties, used by farmers in agriculture and also for the maintenance of roads or amateur gardeners to fight against undesirable macro / living microorganisms. They are used in the composition of some veterinary products, products of wood protection and other materials (varnish, paint, etc.), household disinfectant products used outside agriculture for general hygiene (in hospitals, swimming pools, roads, airfields, railways, etc.) (Rifai, 2013).

Pesticides, also known as plant protection products, agro-pharmaceuticals or protective products, are poisons intended to kill or repel weeds, animals or plants considered harmful to plantations (Amara, 2012).

Pesticides are generally listed using three classification modes by:

- ❖ Origin: organic contains carbon or inorganic derived mainly from minerals.
- ❖ Chemical family: classified according to the chemical nature of the majority active substance and divided into organophosphorus, organochlorine, carbamate, thiocarbamate, pyrethroid and other (El Mrabet, 2008).

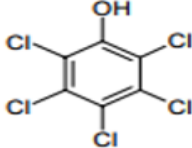
- ❖ Target: classification consists in distributing pesticides according to the type of parasite to be controlled or eliminated. This defines herbicides, insecticides, rodenticides, acaricides, etc.

Among these pesticides, there are the organochlorines pesticides, which are organic compounds, extracted by the chlorination of distinct unsaturated hydrocarbons. Organochlorine pesticides are low water soluble, but their solubility in organic solvents is high. They are very resistant to biological, chemical and photolytic degradation (Juc, 2007). Among the best known organochlorine pesticides, we distinguish Pentachlorophenol (PCP).

II. Pentachlorophenol

Pentachlorophenol is a synthetic substance, made from other chemicals, and does not occur naturally in the environment. PCP is an organic aromatic compound. Pure PCP exists as colorless crystals, has a very strong characteristic phenolic odor when hot but has very little scent at room temperature (Gao et al., 2008). The physico-chemical properties of PCP are summarized in the table 01, below.

Table 01: Physico-chemical properties of pentachlorophenol (ATSDR, 2001).

Chemical formula	C ₆ CL ₅ OH	Melting point	191 °C
Chemical structure		Boiling point	310°C (decomposition)
Molar mass (g / mol)	266.34	Density gas / vapor	9
Density (g / cm³)	1.98	Physical state	Solid (granules or powder)
Steam pressure (mmHg)	1.7 x10 ⁻⁴	Solubility	20-25 (25°C)
partition coefficient (water octanol)	Log k _{ow} = 4.5	Indicative VLEP (mg/m³)	0.5
Henry constant (atm-m³ / mol)	3.4 x 10 ⁻⁶	CE Number	201-778-6
Explosive limits	no data	CAS number	87-86-5

VLEP : Occupational exposure limit values (for: valeurs limites d'exposition professionnelle); CAS = Chemical Abstracts Services ; Numéro CE : Numéro d'identification EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances).

II.1. Becoming a PCP

PCP is released into the air by evaporation, enters surface water and sinks to the bottom of groundwater and also into the soil as a result of spills, disposal at hazardous waste sites, or by its use as a pesticide.

The physical and chemical properties of the compound suggest that a few things will evaporate into the atmosphere and that most of them will move with water and generally stick to soil particles. The movement of PCP in soils and its rate of infiltration depends on these physico-chemical properties (solubility in water, ionization, volatility, persistence in the environment, etc.), but also on the type of soil (moisture, organic matter, acidity). The compound may be present in fish or other species used for food (Besser et al., 2016 ; Du et al., 2017).

Man can be exposed to very low levels of pentachlorophenol by indoor and outdoor air, food, soil, and drinking water (Zheng et al., 2011). Exposure may also result from skin contact with wood treated with condoms containing pentachlorophenol. Contamination risk levels in the workplace, near certain hazardous waste sites and near accidental spill sites are generally higher than in the general environment (Montano et al., 2013).

Exposure to pentachlorophenol through eating contaminated food is limited. It is estimated that the average food intake is 0.0105 mg pentachlorophenol for a 70 kg man. Daily intake by drinking contaminated water is also low and is estimated at about 0.021 mg for a 70 kg man. People who work or live near sources of pentachlorophenol are exposed to higher levels (ATSDR, 2001).

PCP is sensitive to light and may have partial photodegradation, especially when it is in its free dissociated form, either in water with a high pH (half-life of 0.86 hours) or Photo-oxidized form in the atmosphere mainly based on reactions with radical OH[•] (half-life reported 19.43 days) (EPA 2012; Bacon 2014). The resulting products of photodegradation (are illustrated in Figure: 1) are:

- ✓ Tetra- and trichlorophenols.
- ✓ Chlorinated dihydroxybenzenes (tetrachlororesorcinol and tetrachlorocatechol).

- ✓ Non-aromatic fragments (dichloromaleic acid, CO₂ and chloride ions).

PCP is a poorly biodegradable compound in humans. The primary transformation and the mineralization were carried out under natural conditions mainly by the microorganisms existing in the treated soil. The main metabolic pathways are:

- ✓ Methylation to give PCP methyl ether (pentachloroanisole).
- ✓ Acetylation of the hydroxyl group (PCP-acetate).
- ✓ Dechlorination in tetrachlorophenols.
- ✓ Hydroxylation with tetrachlorodihydroxybenzen.
- ✓ Conjugation to produce glucuronide.

These metabolites are further processed and a number of intermediates may occur. The limiting step is the cyclic fission of the chlorinated aliphatic substances which are still dechlorinated and metabolized (Constanze et al., 2014).

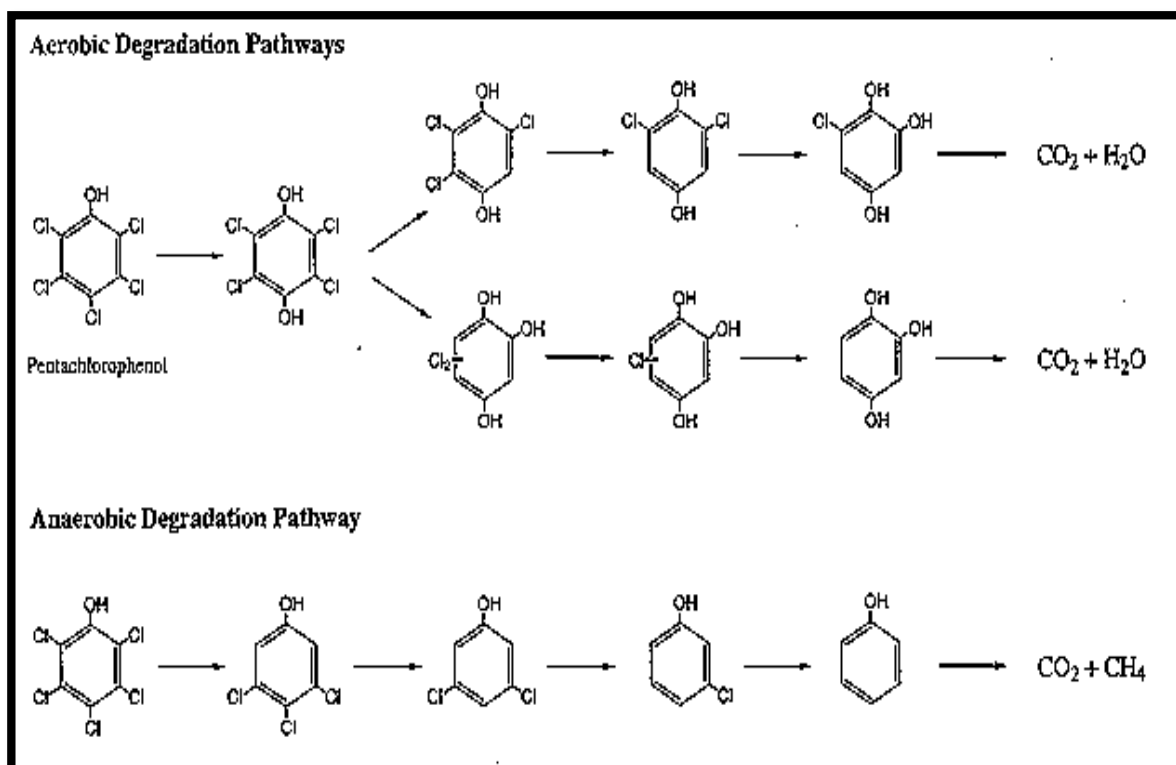


Figure 1: aerobic and anaerobic degradation of pentachlorophenol (Yu and Shepherd, 1997).

II.2. Toxicokinetics

PCP is absorbed orally, dermally and by inhalation (Karlsson et al., 2013). In humans, the average half-life of absorption was calculated at about 1.3 hours, indicating that oral absorption of pentachlorophenol in humans is fast (Braun et al., 1979).

In rats and monkeys, investigators found that oral absorption of PCP from the gastrointestinal tract was rapid, and especially in females than in males, by rate constants (the duration of action of a principle). active) absorption of 1.95 hr^{-1} and 1.52 hr^{-1} for male and female rats, respectively, and 0.215 hr^{-1} and 0.383 hr^{-1} for male and female monkeys, respectively. The absorption half-lives were 3.64 and 1.81 hours for male and female monkeys, respectively (ATSDR, 2001).

Levels of distribution of PCP were measured in the urine and tissues collected from the test element, the product passes into the blood where it combines with plasma proteins. PCP binding to plasma proteins plays an important role in its distribution because proteins reduce the allocation of PCP to different tissues. Results from animal and human studies indicate that pentachlorophenol is not extensively metabolized, as evidenced by much of the administered dose excreted in the unchanged urine in all studied species. Significant plasma protein binding of PCP may explain the low degree of metabolism because protein-bound material is not easily distributed to tissues (Peng et al., 2016 ; Peng et al., 2017).

However, available human and animal data indicate that the metabolism of PCP occurs in the liver (Constanze et al., 2014 ; Peng et al., 2017) and the main pathways are conjugation to form glucuronide and oxidative dechlorination to form TCHQ (Wang et al., 2001). A summary of possible metabolic pathways for PCP is presented in Figure 2.

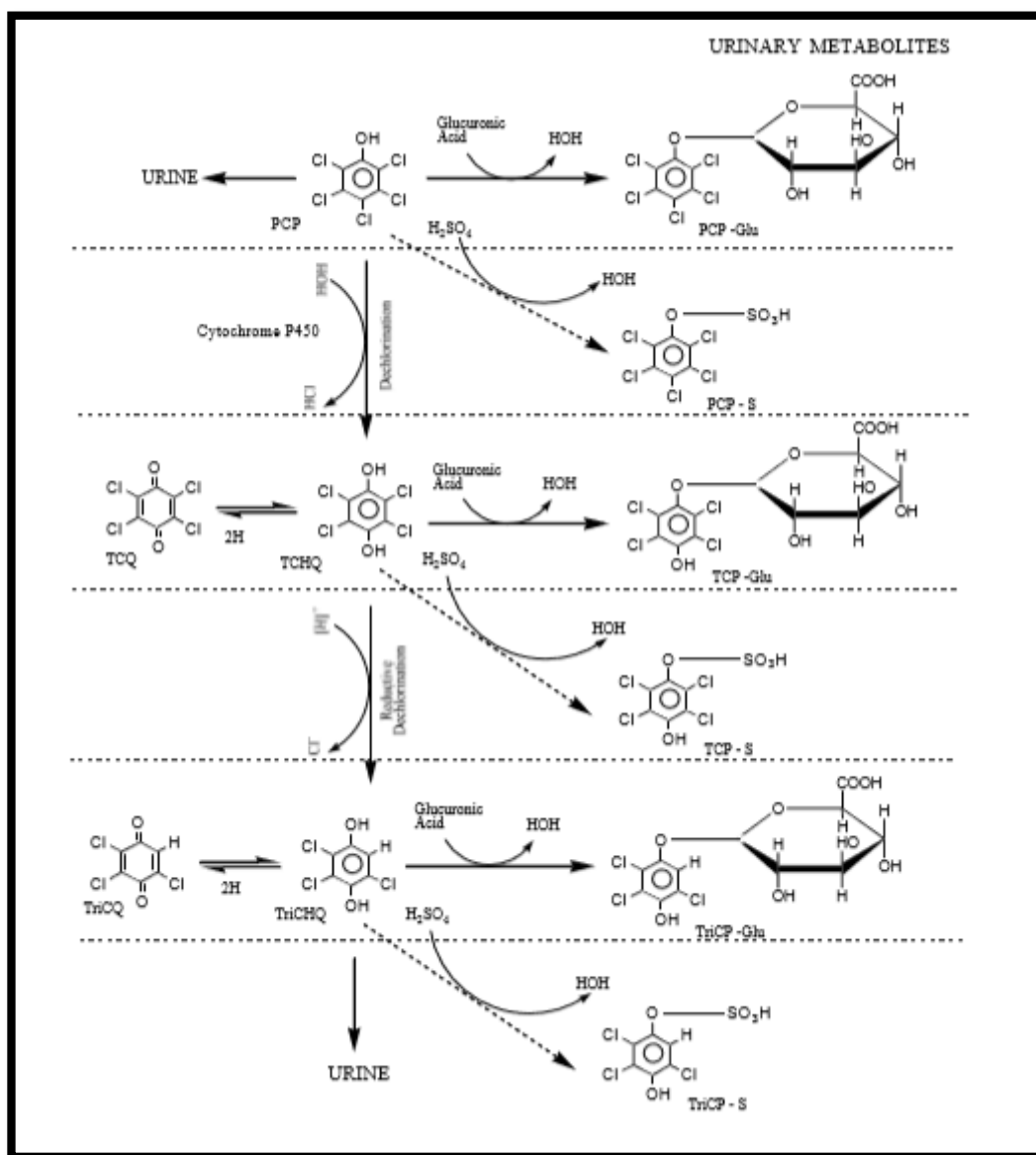


Figure 2: Metabolic pathways of pentachlorophenol (ATSDR, 2001).

PCP : pentachlorophenol; PCP-Glu : pentachlorophenol- β -glucuronide; PCP-S : pentachlorophenylsulfate; TCHQ : tetrachloro-p-hydroquinone; TCP-Glu : tetrachlorophenol- β -glucuronide; TCP-S : tetrachlorophenylsulfate; TCQ : tetrachloroquinone; Tri CHQ = trichloro-p-hydroquinone; Tri CP-Glu : trichlorophenyl- β -glucuronide; Tri CP-S : trichlorophenylsulfate; Tri CQ : trichloro-p-quinone.

In humans, elimination in urine and feces is mainly in the form of free PCP (75% to 80%) or conjugated glucuronide (10 to 15%), the rest of the product being metabolized (oxidation and dechlorination) (Braun et al., 1979). The main metabolite is tetrahydroquinone, which can also be rapidly eliminated in the urine in free form, but especially in glucuron conjugated form (Wang et al., 2001).

Absorption and elimination are fast. In humans, for a dose of 0.1 mg / kg per os, the peak plasma is reached in about 4 hours, the half-life of the product is close to 30 hours; 90% of the product is excreted in 8 days (INRS, 2013).

II.3. Types of toxicity

PCP is unwell soluble in water. It accumulates in the tissues of organisms where it is biomagnified throughout the food chain. Exposure to PCP may result in deterioration of respiratory, hepatic and renal functions and of nervous central reproductive system (Jadwiga et al., 2016 ; Xu et al., 2016).

According to toxicity studies, PCP of technical quality used for the preservation and protection of wood is up to ten times more toxic than pure PCP, since many highly reactive and toxic impurities compose it, such as tetrachlorophenol, trichlorophenols, hexachlorobenzene, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and chlorinated phenoxyphenols (CCME 1999). This contaminant is classified as "possibly carcinogenic to humans".

Acute (or short-term) effects usually result in immediate appearance of symptoms shortly after treatment. Acute poisoning occurs when the subject is exposed to significant amounts of PCP (INRS, 2013).

Whatever the species and route of administration, PCP induces general signs such as fatigue, fever, redness, redness of the eye, visual disturbances, nausea, vomiting, ...) and severe neurological effects (convulsion and weakness progressive neuromuscular), metabolic (hyperthermia), cardiac (elevation of heart rate, heart failure in fatal poisoning), respiratory (cough and chest pain), digestive (diarrhea, abdominal pain) (Mieczyslaw, 2008). In dying animals, cadaveric rigidity is rapid and intense. Autopsy reveals extensive involvement of the vascular system, with congestion and edema of the parenchymal tissues and with lesions of the small vessels (ATSDR, 2001).

Chronic (or long-term) effects develop with the appearance of a pathology after repeated exposures over time, for doses of PCP most often low, which are likely to accumulate in the body or lead to irritative phenomena in different organs. Chronic toxicity may also be the result of repeated acute poisoning.

Sub-acute and chronic studies in rats show that the toxic effects are mainly in the liver; In particular, morphological changes in hepatic cells, increases in liver weight and certain microsomal enzymatic activities, and greatly increased excretion of porphyrin and δ -aminolevulinic acid have been demonstrated, depending on the dose and duration of treatment.

In cattle treated at a dose of 15 mg / kg / day for 42 days, liver lesions also exist but are more subtle than in rats (McConnell et al., 1980). In many studies, the hepatotoxicity of the technical product is much higher than that of the pure product; it is therefore due, for a large part, to the present impurities (ATSDR, 2001).

III. PCP and oxidative stress

«The notion of oxidative stress is the incapacity of the organism to defend itself against the aggression of the ROS, following a related imbalance, either to an increased production of the ROS, or to a decrease of the capacity of antioxidant defenses» (Sies, 1991).

Numerous mechanisms contribute to this disequilibrium either by preferring the production of ROS such as hyperglycemia, high tissue lipid concentrations (ectopic adiposity), chronic inflammation, infiltration and excessive activation of leukocytes, their production by liposomes, endothelium, the excessive production of hormones of the renin-angiotensin system, and hyperleptinemia (Vincent et al., 2007), or by the insufficiency of antioxidant defenses such as a low dietary intake of natural antioxidants, vitamins (C, E, carotenoids) and minerals (zinc, selenium, magnesium). Moreover, the combination of these mechanisms will contribute to systemic oxidative stress (Lavoie, 2012; Weigand-Heller et al., 2012).

Antioxidants are molecules that can slow down or prevent the oxidation of other chemicals in their contacts. Oxidation is part of a redox reaction that transfers electrons from a substance to an oxidizing agent. This reaction can produce radicals that lead to destructive chain reactions. Antioxidants are able to stop these chain reactions by reducing with the radicals and thus annihilating their action. These properties are much in the families of thiols and phenols (Maja et al., 2015).

The organisms have a system of antioxidants and enzymes that work together to prevent damage to cell components such as DNA, lipids and proteins by ROS (Saleem et al., 2014).

III.1. Mode of toxic action of PCP

The mechanism of the toxic action of PCP has been demonstrated: it involves the decoupling of oxidative phosphorylation (process allowing the phosphorylation of ADP into ATP released by oxidation) mitochondrial. The identification of the mechanism of this decoupling was elucidated when the protein responsible for the phenomenon was isolated: UCP (UnCoupling Protein) (INRS, 2013). Toxicity of PCP has been attributed to membrane perturbation of the cell and dissipation of the protonic motive force (PMF) (Mukhopadhyay et al., 2004 ; Sophie et al., 2004). The onset of toxic properties was associated with damage to the membrane electrical system when a significant amount of PCP binds to the membrane. This leads to the production of superoxide anion and hydrogen peroxide at a very high level, causing cellular and tissue oxidative stress and various alterations (Kan et al., 2015) at :

✓ Mitochondria

a. Disturbance of electron flow and overproduction of ROS

The respiratory chain oxidizes the substrates and then the electron transfer induces a proton pumping out of the mitochondria. This creates an electrochemical gradient of protons, which opposes pumping and consequently to oxidation (Sophie et al., 2004). The resulting electrochemical gradient provides the energy needed to drive a molecular rotor that allows ATP synthase to produce ATP.

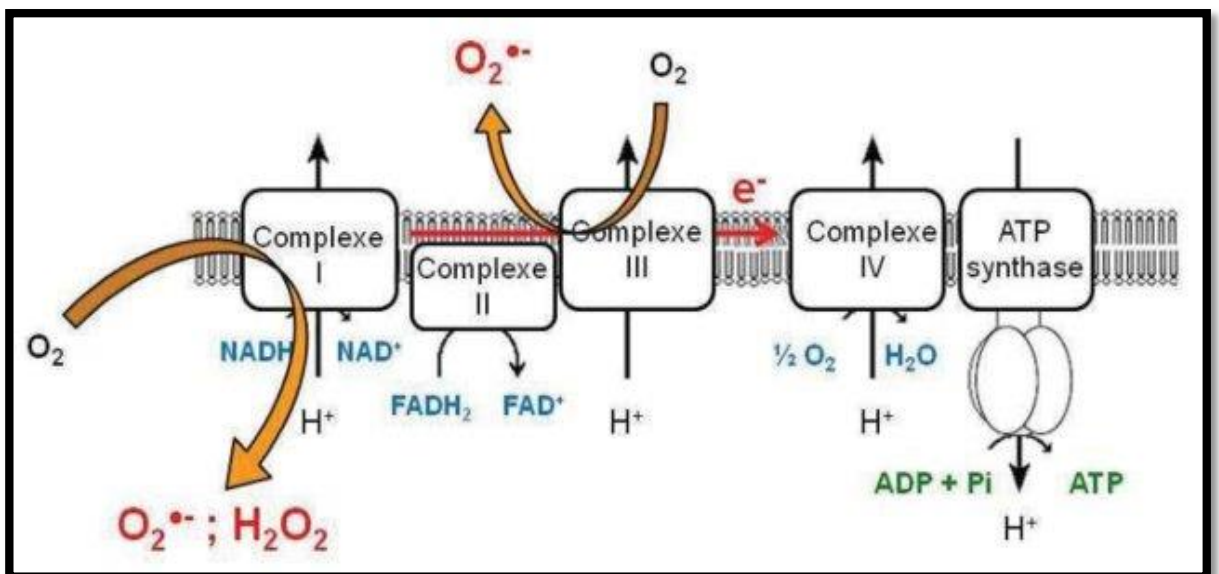


Figure 3: Production of ROS in the mitochondrial respiratory chain (Degletagne, 2011).

b. Changes in the enzymatic configuration

This may well also induce changes in the enzymes involved in oxidative phosphorylation, since the superoxide ion will interact with the UCP by increasing the transport of protons by this protein to the matrix (Daniel et al., 2002). As a consequence, the UCP-O₂^{•-} interaction is an important factor in the decoupling phenomenon by decreasing the electrochemical gradient, and thus facilitating electron transfer and oxidation of coenzymes (Raha, 2000).

When the electrochemical gradient of protons becomes dominant, the electrons are blocked in the respiratory chain and some can react with molecular oxygen. This leads to the production of superoxide anion and hydrogen peroxide at a very high rate that increases oxidative damage (figure (5) (Zhou G et al., 2013).

c. Loss of cellular energy

Such interaction may induce configuration changes in enzymes associated with oxidative phosphorylation, or prevent the binding or refixing of structural or functional factors essential to this bioenergetic process. This phenomenon leads to a loss of energy for the cell since the energy of the oxidations is not used to synthesize ATP, it is totally dissipated in the form of heat. There is no more coupling between respiration and ATP synthesis. If ATP production occurs, it appears with a lower electrochemical potential (in the order of 130-150 milliVolts, Figure 4) (Daniel et al., 2002).

The urinary elimination of the product explains that the renal lesions reinforce its toxicity. It is generally believed that PCP causes accelerated aerobic metabolism and increases heat production and causes the loss of membrane electrical resistance (INRS, 2013).

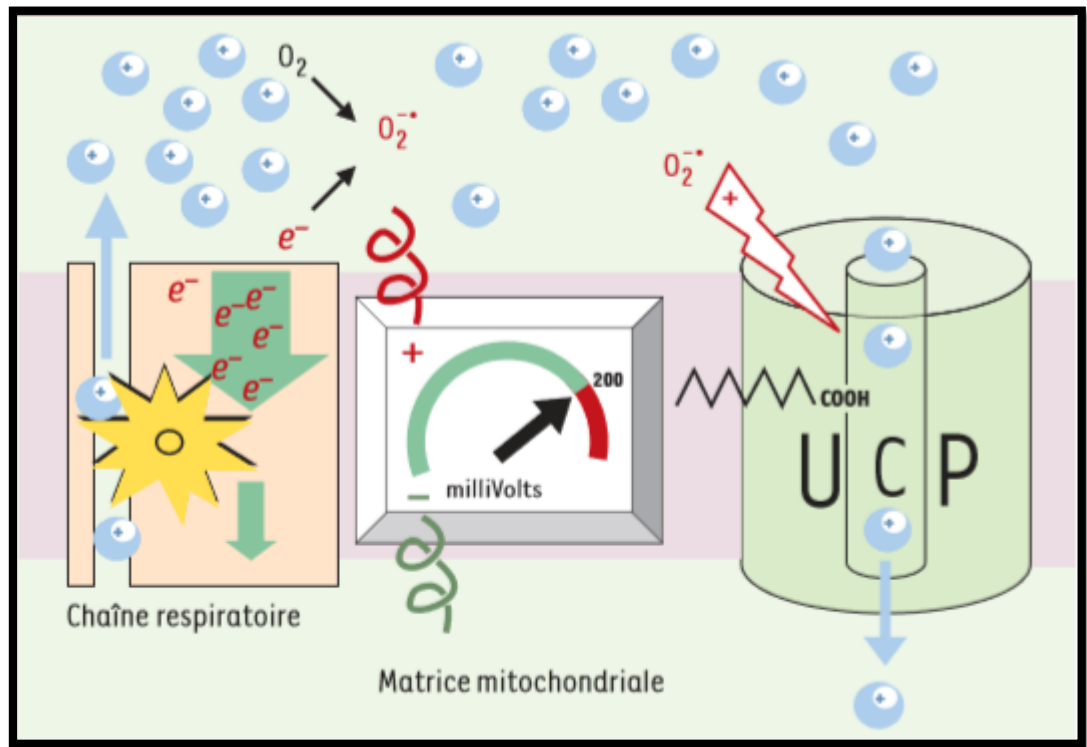


Figure 4: Activation of superoxide ion transport via UnCoupling Protein (Daniel et al., 2002).

The components of cells can be damaged by ROS, such as DNA, lipids and proteins. These damages are illustrated in the figure: 5.

➤ DNA damage

DNA can be targeted by some endogenous source components including ROS, by inducing covalent changes (nucleotide base lesions: purines and pyrimidines), single-strand breaks or double-strand breaks in the oligonucleotide chain, or binding with protein residues (Wang, 2008). These modifications have many gravities on the replication of the genome and consequently the induction of many types of tumors (Trachootham et al., 2009).

PCP promotes the deregulation of several genes related to oxidative stress and overexpression of molecules involved in cell cycle control. It promotes the accumulation of MDA and 8-OHdG (8-oxodeoxyguanosine), which are considered biomarkers of oxidative lesions induced by free radicals. Both molecules may reflect the degree of oxidative damage to DNA and are positively correlated with the degree of oxidative stress *in vivo* (He et al., 2016). In rats, chronic exposure to PCP increased the level of MDA, OHdG, and direct adducts in hepatic DNA, but was not sufficient to induce hepatocarcinogenesis (Sai-kato et al., 1995).

➤ Lipids damage

Polyunsaturated fatty acids are frequently targeted by ERO. Lipid peroxidation is the degradation of membrane lipid content as well as lipoproteins, which can induce functional alterations through modifying their permeability and fluidity as well as acting on the movement of enzymes and receptors (Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2010). This process takes place in three phases:

- ✓ Initiation: The free radical annihilates a hydrogen from a methylene group (-CH₂-). In the existence of O₂, the carbon radical is transformed into a peroxy radical RO₂'.
- ✓ Propagation: The radical RO₂' tears a hydrogen from another neighboring polyunsaturated fatty acid which in turn will create a radical R' then a radical RO₂', a chain reaction is established.
- ✓ Termination: In existence of the transition metals, the resulting hydroperoxides can meet and cleave at the DC bonds and produce new stable (decomposition products), the most toxic of which are: malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (Lehucher, 2001).

➤ Proteins damage

The proteins can identically be targeted and structurally modified by fragmentation or denaturation during radical or oxidative reactions under the action of the ERO and ERN. Some oxidation reactions are influenced by metal cations (copper and iron) (Servais, 2004). For example, the oxidation of the side chains of amino acids, particularly cysteine and methionine, is accomplished with disulfide bridges. PCP is capable of inducing oxidative stress, apoptosis and cell cycle arrest as a consequence of DNA damage (p53), mitogenic response (cyclin D1) and apoptosis (caspase 3) (Dorsey et al., 2006).

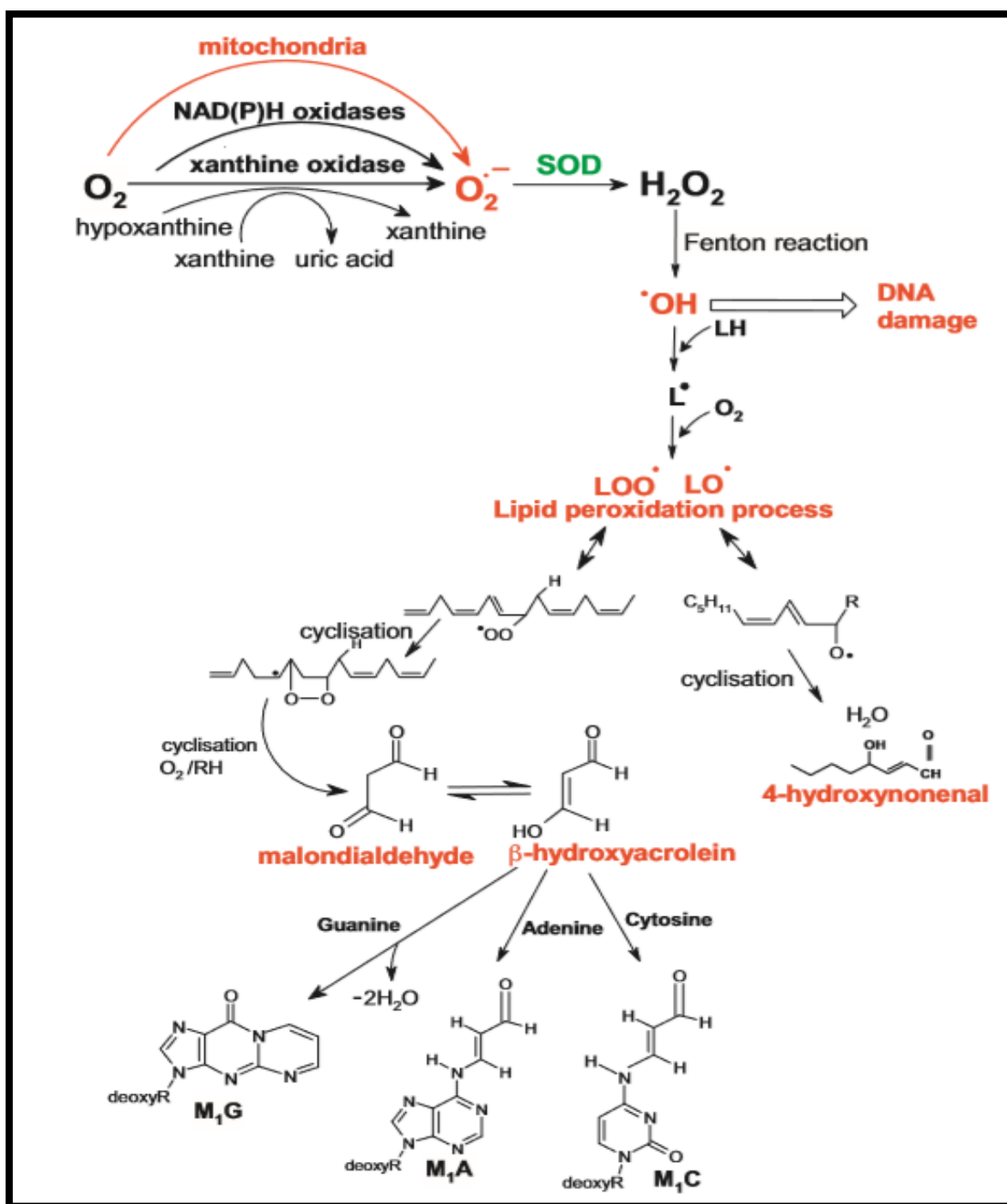


Figure 5: Formation of ROS and the induction of damage to cell components such as DNA, lipids and proteins (Jomova and Valko, 2011).

In general terms, figure (06) illustrates the mechanism of action of pesticides, which could enter cells directly through the membrane or through transport mechanisms. Thus, they could act directly on the NADH / NAD⁺ balance by increasing the ROS that would disrupt the mitochondrial

function. But they could also act directly on the complex I of the respiratory chain resulting in an increase of the ROS, an induction of the apoptotic mechanisms by a release of the cytochromes C and a caspase activation, an alteration of the nuclear DNA, as well as an oxidation and aggregation of proteins, such as α -synuclein (a protein found on synaptic terminals, protects dopaminergic cells against neurotoxicity (Steeve et al., 2013)).

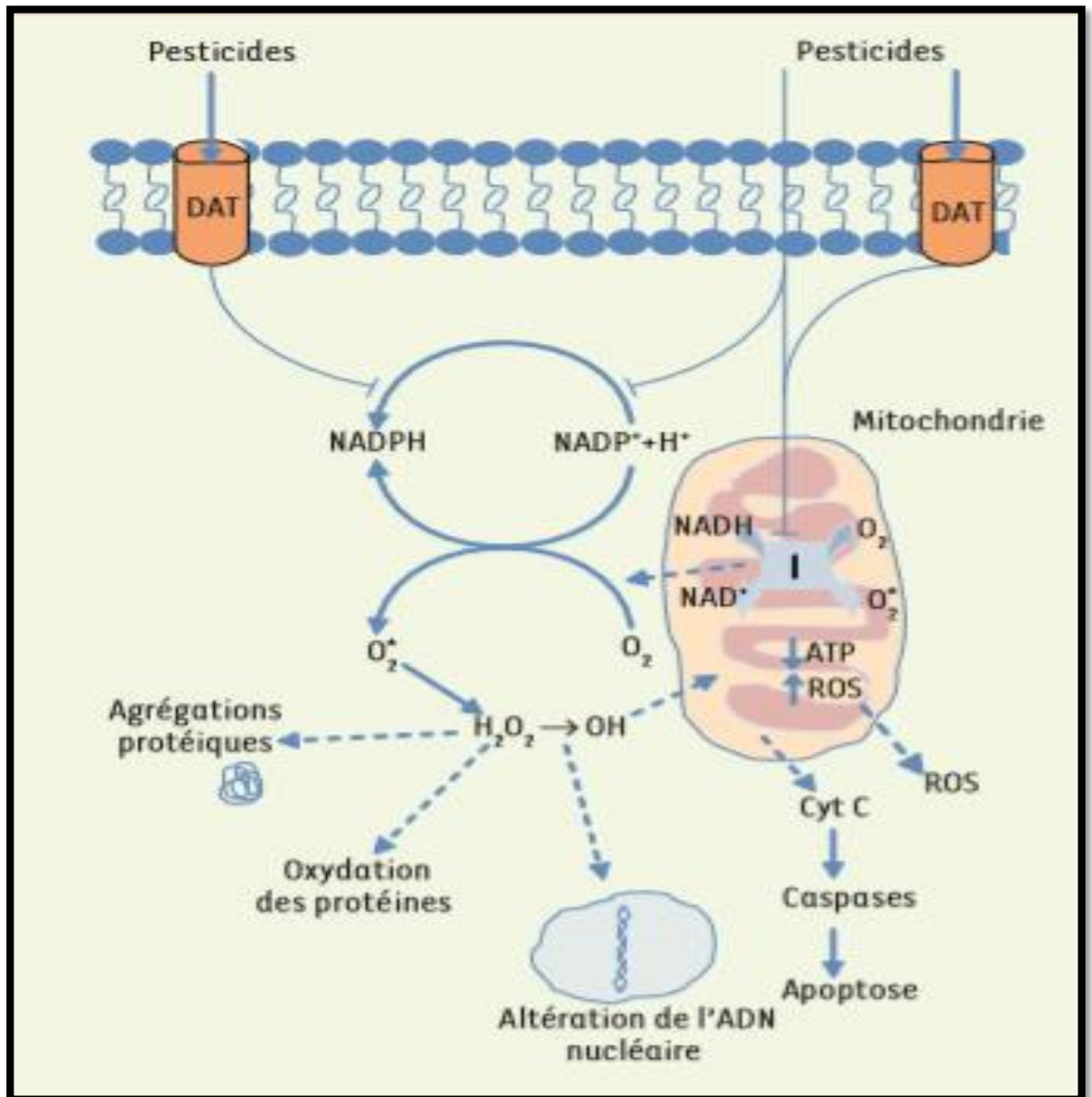


Figure 06: Effects of pesticides on mitochondria and consequences at the cellular level (Steeve et al., 2013).

III.2. Effects of PCP

III.2.1 Genetic, mutagenic and carcinogenic effects

Some effects may also result from chlorinated dibenzo-p-dioxin and other impurities in PCP of technical quality. The negative effect of pure PCP on thyroid homeostasis and the induction of oxidative DNA damage by oral exposure to PCP may also contribute to its spectrum of toxic effects (ATSDR, 2001).

On the other hand, the application of 50 μ M PCP results in a formation of 17 adducts per 109 nucleotides in rat liver cell cultures, 11 adducts per 109 nucleotides in quail cell cultures, and 4.2 adducts per 109 nucleotides in human liver cell cultures. Adduct formation is accompanied by PCP induction of CYP1A and CYP2B and CYP3B for human and animal cells (Dubois et al, 1997).

Other studies of PCP and its quinoid metabolites note oxidative stress in addition to direct binding to DNA. PCP (*in vivo* test, 60 mg / kg / day for 27 weeks), tetrachloro-1,4-benzoquinone (*in vitro* test, 5 mM) and tetrachlorohydroquinone (*in vitro* test, 5 mM) lead to the formation of different adduct types and significant elevation of AP sites, and single-strand breaks in DNA (Lin et al, 2002).

PCP is weakly mutagenic in mice and can be mutagenic in yeasts. Low mutagenic effects were observed in human lymphocyte cultures exposed to PCP. Evidence suggests that PCP is non-mutagenic or weakly mutagenic (Mieczyslaw, 2008).

No convincing evidence of the carcinogenic effects of PCP in humans is available (ATSDR, 2001). Current evidence is not sufficient to assess the potential of PCP to cause carcinogenic effects in humans. According to Lin et al., 2002, the generation of reactive oxygen species, oxidative DNA damage and direct DNA adducts are not sufficient for the induction of PCP-induced hepatocarcinogenesis in the rat.

The European Union has classified PCP as R40: limited evidence of a carcinogenic effect (EC, 1993). The International Agency for Cancer Research (IARC) considers that pentachlorophenol may be carcinogenic to humans (group 2b). This conclusion was based on the fact that there was insufficient evidence in humans, but sufficient evidence on the carcinogenicity of pentachlorophenol in laboratory animals (IARC, 1991).

III.2.2. Effects on the endocrine system and reproduction

Exposure to PCP can cause morphological deformities, possibly affecting the coordination of development in the central nervous system and altering thyroid hormone levels by disrupting the thyroid hormone regulatory pathways with possible hyperthyroid effects. Exposure to PCP at 10 µg / L resulted in elevated levels of 3, 3', 5-triiodothyronine (T3) and decreased thyroxine levels (T4) (Yang et al., 2015). PCP produces decreases in circulating and free concentrations of thyroid hormones T3 and T4. Both PCP induces an increase in mean serum insulin concentrations. No alterations in cortisol levels have been demonstrated (Rawlings et al., 1998).

No alteration in average number of motile or non-motile spermatozoa, epididymal or testicular sperm counts, or sperm morphology. In addition, there is no alteration of the reproductive hormones (estradiol, testosterone, progesterone, follicle-stimulating hormone and / or luteinizing hormone) and no histological alterations in the reproductive tissues (ATSDR, 2001). PCP reduces cumulative egg production and fertilization rate, increases malformation, and inhibits the body length of zebra fish larvae (Wen et al., 2019).

Experiments in rats indicate that PCP does not cause reproductive effects (Gasiewicz, 1991).

III.2.3. Hepatic, renal and respiratory effects

The liver is a target organ of PCP-induced toxicity. Acute, intermediate and chronic oral exposure to PCP revealed signs of biochemical (alterations in liver enzyme activities), morphological (increased liver weight) and histopathological (hypertrophy, vacuolation, hyperplasia, fibrosis, necrosis and degeneration) (Agha et al., 2013).

In low doses, effects on the liver are characteristic of enzyme induction, increases in liver weight, hepatocellular hypertrophy and vacuolation. The severity of liver damage increases with increasing exposure concentrations (Peng et al., 2016). The biochemical changes consisted of an increase in serum alanine and aspartate aminotransferase levels (Agha et al., 2013).

There is evidence of mild to moderate renal toxicity following long-term exposure to PCP. The most commonly reported toxic effects on the kidneys include increased weight, changes in enzyme levels, impaired glomerular filtration and tubular function, mild renal tubular degeneration, and fatty vacuolar changes in the renal tubules (Abhay and Sunanda, 2015).

Renal toxicity by PCP is related to structural damage and glomerular function, which can be remarkable by biochemical changes. For example, an increase in Nitrogen concentration in the

blood, a decrease in proximal tubular alkaline phosphatase activity, an increase in specific gravity of urine, and an incidence of dose-related kidney discoloration (Villena et al., 1992). The biological significance of these seemingly transient renal effects with respect to long-term toxicity is not known. Histopathological effects are rarely observed.

PCP increases the incidence of metaplasia of the nasal mucosa and goblet cell hyperplasia in mice, causes inflammation of the upper respiratory tract and bronchitis (ATSDR, 2001).

There is evidence of mild to moderate renal toxicity following long-term exposure to PCP. The most commonly reported toxic effects on the kidneys include increased weight, changes in enzyme levels, impaired glomerular filtration and tubular function, mild renal tubular degeneration and fatty vacuolar changes in the renal tubules (Abhay and Sunanda, 2015).

Renal toxicity by PCP is related to structural damage and glomerular function, which can be remarkable by biochemical changes. For example, an increase in Nitrogen concentration in the blood, a decrease in proximal tubular alkaline phosphatase activity, an increase in specific gravity of urine, and an incidence of dose-related kidney discoloration (Villena et al., 1992). The biological significance of these seemingly transient renal effects with respect to long-term toxicity is not known. Histopathological effects are rarely observed.

PCP increases the incidence of metaplasia of the nasal mucosa and goblet cell hyperplasia in mice, causes inflammation of the upper respiratory tract and bronchitis (ATSDR, 2001).

III.2.4. Hematological, cardiovascular and neurological effects

PCP can induce hematological effects. For example, a decrease in the number of white blood cells, a decrease in hemoglobin and erythrocytes, aplastic anemia. PCP can also cause tachycardia, this effect may be the result of its ability to decouple oxidative phosphorylation, leading to hyperthermia. It also faces the occurrence of extensive vascular lesions and heart failure (Rugman and Cosstick 1990).

In addition PCP causes various symptoms in man included: pyrexia, diaphoresis, hyperkinesis, muscle contractions, tremor, epigastric tenderness, leg pain, tachypnea and tachycardia due to the ability of PCP to decouple oxidative phosphorylation (resulting in increased body temperature) rather than a direct toxic effect of PCP on central or peripheral nervous systems. It can induce delirium, intermittent convulsions and irritability.

The PCP-induced overproduction of ROS also contributes to neurotoxicity. Mouse neuroblastoma cells in culture showed an increase in cell detachment with PCP exposure. PCP has also been found to affect the maturation of myelin, although it is not clear whether this effect is due to the direct action of PCP on the myelin sheath or to a disturbance of the intake of food or lipid metabolism. PCP is a neurotoxic compound that causes cell death in cerebellar granular neurons (Jaume et al., 2009).

III.3. Methods for evaluating oxidative stress

ROS are difficult to measure because of their short life span and high reactivity. Currently, there are direct methods and processes that are supposed to evaluate oxidative stress, however, they are difficult and expensive (Halliwell and Whiteman, 2004). In order to estimate the extent of oxidative stress, indirect techniques are frequently used by measuring biomarkers or end products of processes caused by ROS (Lavoie, 2012).

These biomarkers involve superoxide dismutase enzymes (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GSH), glutathione peroxidase (GPx), glutathione concentrations and antioxidant vitamins (vitamin A, E, and C), lipid peroxidation (MDA level), and the concentration of nitrite and non-enzymatically glycosylated proteins. The measurement of lipid peroxidation and protein oxidation are the most common denunciators of oxidative damage. ROS are cytotoxic and may express enzymatic dysfunctions, cell membrane damage and receptor binding to these membranes. ROS can modify signaling cascades (eg insulin, etc.) and activate other processes such as inflammation (Lavoie, 2012).

IV. Phytotherapy

Phytotherapy is the use of medicinal plants and potentially beneficial herbs for the therapeutic purposes, prevention and treatment of various syndromes (Jeyaprakash et al., 2011).

Natural substances from plants have multiple interests that are used in industry: food, cosmetology and dermatopharmacy. Among these compounds, we find the secondary metabolites which have been especially illustrated in therapy to a large extent. The World Health Organization has reported that a majority of the universal population relies on plants as the main source for treating many diseases in primary health care.

Traditional medicine, which is the sum total of rationally and non-rationally based knowledge, skills and practices, on culture-specific theories, beliefs and experiences, is used to keep people healthy and to prevent, diagnose, treat and cure physical and mental illnesses (WHO, 2003).

Many prescriptions of herbal folk remedies are still commonly used to prevent systemic disorders until today.

The recent pharmaceutical factory is wondering about the diversity of plant secondary metabolites to discover modern molecules with original biological possessions. This fountain seems inexhaustible since only a small part of the 400,000 known plant species have been investigated phytochemically and pharmacologically, and each species can hold up to several thousand different ingredients (Hostettmann et al., 1986).

Plants are exceptionally complicated from the point of view of their chemical composition. They are made up of several thousand different constituents, some of which are exclusively (or sometimes only one) responsive to therapeutic or toxic effects. It is therefore necessary to test the active ingredients of medicinal plants to study their effectiveness, their mode of action, and certainly their side effect on human health.

Algeria has a great diversity of flora and a secular tradition of traditional use of plants. In 1983, Ozenda declared that Algeria has more than 3,000 species belonging to several botanical families of which 15% are endemic species (Ozenda, 1983). Its geographical location between the Mediterranean Sea and the Sahara, has contributed to a varied topography with different elevations, diversity of soil types, and a variety of climatic zones as well as microclimates ranging from dry and warm to temperate and humid. These factors have resulted in a relatively large geographical area with a very varied flora arranged with many uses and traditions. As a result, the older generation of Algerians relied heavily on herbal medicine, and herbs such as sage, thyme, rosemary, lavender, mint and chamomile were commonly grown in gardens.

This medicinal plant potential includes thousands of species with various interests and is a focus of scientific research, especially in the field of natural substances. From the 1980s, Algerian teams focused their studies on this type of work. The faculties of Biology and Chemistry of the University of Constantine were the pioneers in this field. In addition, photo-pharmacological investigations have been investigated to have natural sources of new chemical structures with effective protective effects against different xenobiotics (Zama et al., 2007; Amrani et al., 2014, Boubekri et al., 2014, Djebbari et al., 2017).

IV.1 Polyphenols

IV.1.1. Properties

Recently, several investigations have focused on phenolic compounds and mainly on their chemical structures in different plant materials, their probable preventive roles against many diseases associated with oxidative stress (cardiovascular and neuro-degenerative diseases and cancer), their ability to bind to proteins (particularly flavonoids), their role in the stabilization of edible oils, the protection of flavor formation and flavor stabilization, and their dominant content in the preparation of several food supplements (Hurtado et al., 2010).

Phenolic compounds are widely distributed in the plant kingdom with more than 10,000 types identified so far. The three most abundant phenolic compounds are phenolic acids, flavonoids and polyphenols.

Phenols present either in conjugated form with numerous sugar residues, or linked with other chemical compounds, such as carboxylic acids, amines or lipids or with other existing phenols (Martin and Andrantsitohaina, 2002). The free phenols are soluble in polar organic solvents (alcohol, ketone, ether), Na hydroxide solutions and Na carbonate. But, the glycosides are soluble in water. They are unstable compounds that can undergo oxidation especially in alkaline medium or isomerization under the action of UV.

IV.1.2. Biosynthesis of polyphenols

Phenolic compounds are secondary metabolites synthesized by plants during their normal development. They are produced either on chloroplasts as a defense against oxidative damage caused during photosynthesis, or on the level of sexual organs whose purpose is the protection of plant material against ultraviolet (UV) rays. Some phenols can be produced at root level as attractive to bacterial and fungal symbionts, or in response to microbial infections (viruses, bacteria, fungi) and insect wounds. These phytochemicals derived from phenylalanine and tyrosine are ubiquitous in plants (Pereira, 2012).

Phenolic compounds are non-nitrogenated aromatic hydroxy derivatives whose aromatic rings (of at least one Aromatic nucleus linked to a free or committed hydroxyl group) originate from two distinct biogenetic pathways, namely the metabolism of shikimic acid (cinnamic acid benzenic acid, coumarins, lignans, etc.) or that of a polyacetate (chromones, quinones, etc.). The structural multiplicity of phenolic compounds reduced to this double biosynthetic origin is still frequently developed by the occasion of a parallel association of Shikimate and acetate with the

compounds arrangement of mixed origin (flavonoids, Stilbenes, Xanthones, etc.) Martin and Andrantsitohaina, 2002).

IV.1.3. Classification of polyphenols

Depending on the number of carbon atoms and the basic skeletal structure, several classes of phenolic compounds existing in vegetative matter are distinguished, the main ones of which are illustrated in the following table:

Table 02: The major classes of phenolic compounds in plants (Hany,2017).

Number of carbon atom	Basic skeleton	Class
6	C6	Simple phenols benzoquinones
7	C6-C1	Phenolic acids
8	C6-C2	Acetophenones tyrosine derivatives
9	C6-C3	Hydroxycinnamic acid, coumarins
10	C6-C4	Naphthoquinones
13	C6- C1-C6	Xanthones
14	C6- C2-C6	Stilbenes
15	C6- C3-C6	Flavonoids
18	(C6- C3) 2	Lignans
30	(C6- C3-C6) 2	Bioflavonoids
N	(C6- C3-C6) n	Condensed tannins

Phenolic compounds are frequently simple such as flavonoids, stilbenes, lignans and phenol acids. These phenolic acids are hydroxylated derivatives of either benzoic acid (C6-C1) such as salicylic acid and gallic acid, or cinnamic acid (C6-C3) such as caffeic acid and ferulic acid. These are in conjugated forms of esters and glycosides and sometimes are free. The phenolic compounds can be complex and especially have a protein-combining property hence their ability to tan leather. Structurally, the tannins are divided into two groups, hydrolysable tannins and condensed tannins.

IV.2. Flavonoids

IV.2.1 Characteristics

The term flavonoid is derived from the word "Flavus" in Latin, which means yellow. Flavonoids form an important part of the various polyphenolic molecules, of which more than 6,000 structures have been identified (Ogata et al., 2000). Flavonoids in the broad sense are virtually universal pigments of plants, their main function seems to be the coloring of plants (Gao et al., 1999).

Structurally, the flavonoids are low molecular weight compounds, have a base backbone with 15 carbon atoms, made of two C₆ "A and B" benzene rings connected by a C₃ bridge. This bridge usually forms a third pyrone cycle. The distinction of the subclasses is made on the conformation of this central structure "C", we will quote the most important: anthocyanins, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones and proanthocyanidols (Brandet al., 1995). Figure (7) summarizes the different groups and subgroups derived from flavonoids.

The flavonoids are present either in the aglycosylated form, or predominantly glucosylated within the plants since the glycosylation has the effect of making them less reactive (protection of the tissues against the harmful effects of the solar radiation) and more water-soluble allowing then their storage in the vacuoles epidermal cells of the flowers, epidermis and mesophyll of leaves, parenchyma of stems and roots (Soares et al., 1997).

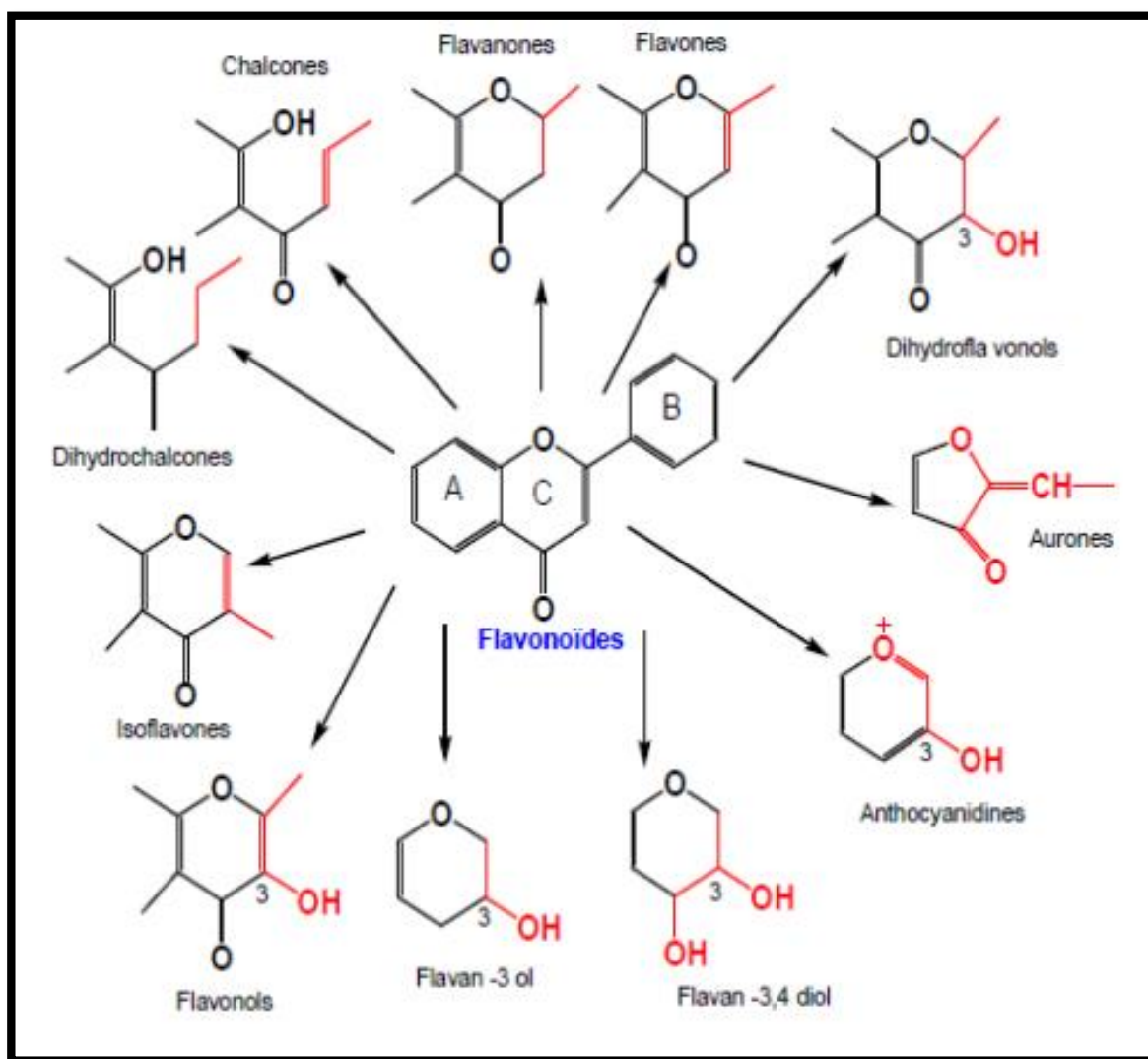


Figure 7: Representation of the main flavonoid groups (Daroui-M, 2012).

IV.2.2 Biosynthesis of flavonoids

The biosynthesis of the latter presents a common intermediate, a tetrahydrochalcone from which several types of compounds are differentiated, the most important of which are anthocyanins and flavones. On the other hand, 4, 2', 4', 6'-tetrahydrochalcone, formed by chalcone synthase from malonyl-CoA, a precursor of the acetate-malonate pathway, and 4-coumaroyl-CoA, from the pathway Shikimate (Figure 8). Flavonoids can then be modified by hydroxylation, methylation, glycosylation and acylation reactions (Maatooq 2002, in Bouhroum, 2007). The concentration of flavonoids is maximum in the young organs and in the external and aerial tissues because the light stimulates their biosynthesis.

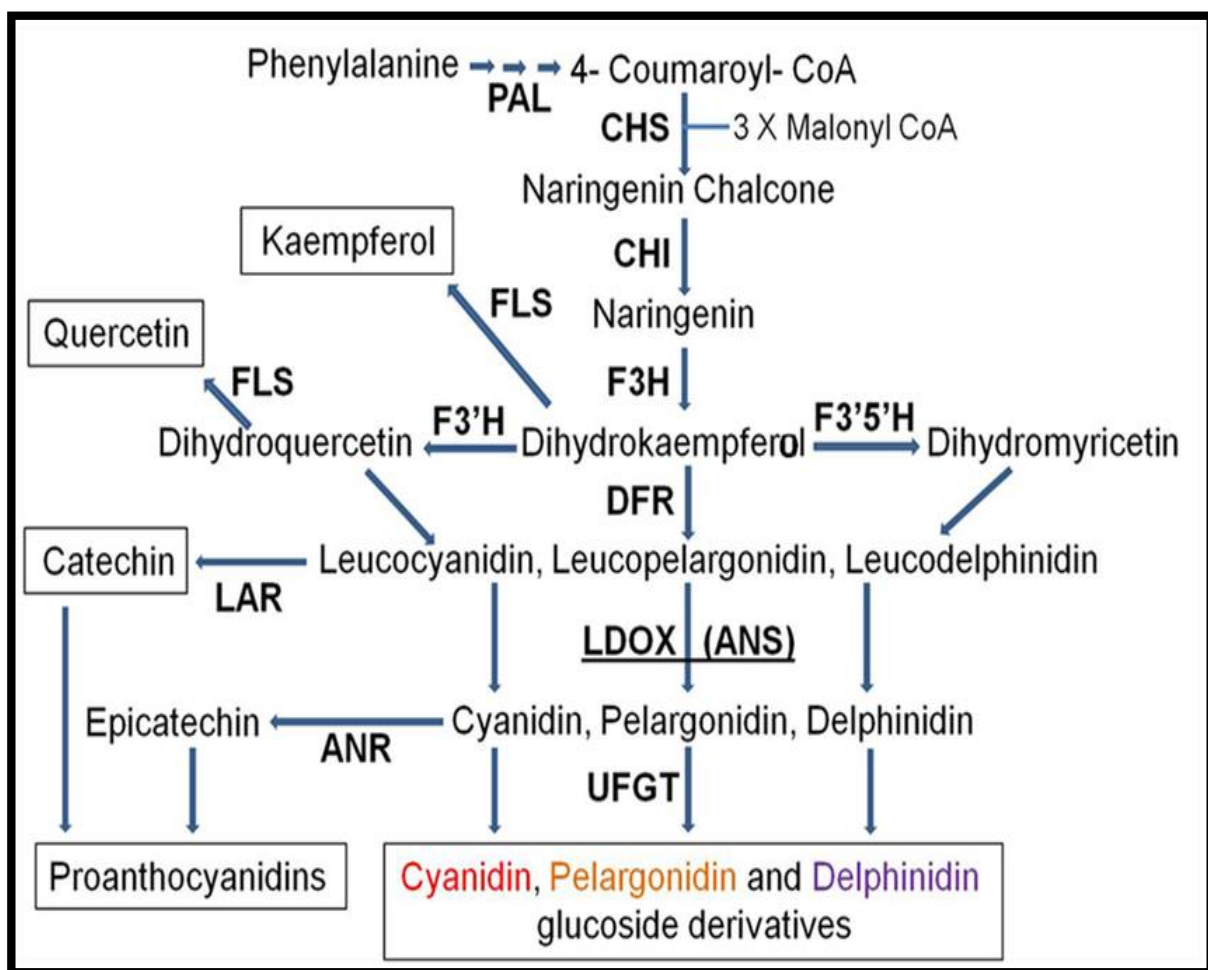


Figure 8: Biosynthesis of Flavonoids (Ben-Simhon et al., 2015).

IV.3. Absorption and metabolism of polyphenols

The continued metabolism of polyphenols in humans is crucial for determining which ones are more absorbed and which leads to the production of bioactive metabolites. Most plant-derived polyphenols have to undergo intestinal transformations, through microbiota and enterocyte enzymes, to be absorbed at the enterocyte and colonocyte levels, as shown in Figure 09. The absorption of polyphenols is conditioned by their difference in structure and molecular mass (Scalbert, 2001; Laura et al., 2015).

After the consumption of flavonoids, enzymatic cleavage (by the phyllizin hydrolase LPH lactase or cytosolic β -glucosidase CBG) of sugar fragments bound to the phenolic skeleton take place in the small intestine. After hydrolysis of glycosylated flavonoids, aglycones enter the intestinal epithelial cells through passive diffusion (Day et al., 2000).

While the hydrolysis of flavonoids linked to a rhamnose fragment occurs in the colon, thanks to α -rhamnosidases secreted by the microbiota (*Bifidobacterium dentium*) to facilitate its absorption (Bang et al., 2014). In particular, unglycosylated flavonoids in foods (catechins from green tea) are simply absorbed into the small intestine without modification (Nakagawa et al., 1997).

Certain phenolic compounds acylated by gallic acid (epicatechin) instead of glycosylated are absorbed in the enterocytes without any deconjugation or hydrolysis. Proanthocyanidins are high molecular weight polymers that are absorbed in the small intestine in their native form (Deprez et al., 2001).

In human tissues, there are no esterases capable of breaking the ester bonds of hydroxycinnamic acids which are generally esterified to sugars, organic acids and lipids. As a result, the metabolism of these is accomplished by the colonic microbiota, although up to one-third of their absorption can also occur in the small intestine (Erk et al., 2014). Thus, there are hydroxycinnamic acids, (polymers such as ellagitannines) can resist against LPH or CBG. But when arriving at the colon, the microbiota can cleave the conjugation fragments and metabolize the resulting aglycones (Landete, 2011).

After the absorption of the final derivatives or aglycons either in the small intestine or in the colon, they undergo a certain degree of phase II metabolism in the enterocytes, such as methylation, sulfation and glucuronidation. These products then enter the blood through the portal vein, accessing the liver, and are conjugated and transported into the bloodstream until they secrete into the urine (Selma et al., 2009; Laura et al., 2015). Some hepatic conjugates are then excreted as biliary components in the intestine and enterohepatic recirculation is completed. In particular, the deconjugated compounds are regenerated by intestinal microbial enzymes before being reabsorbed again. Unabsorbed metabolites are eliminated by feces (Cardona et al., 2013).

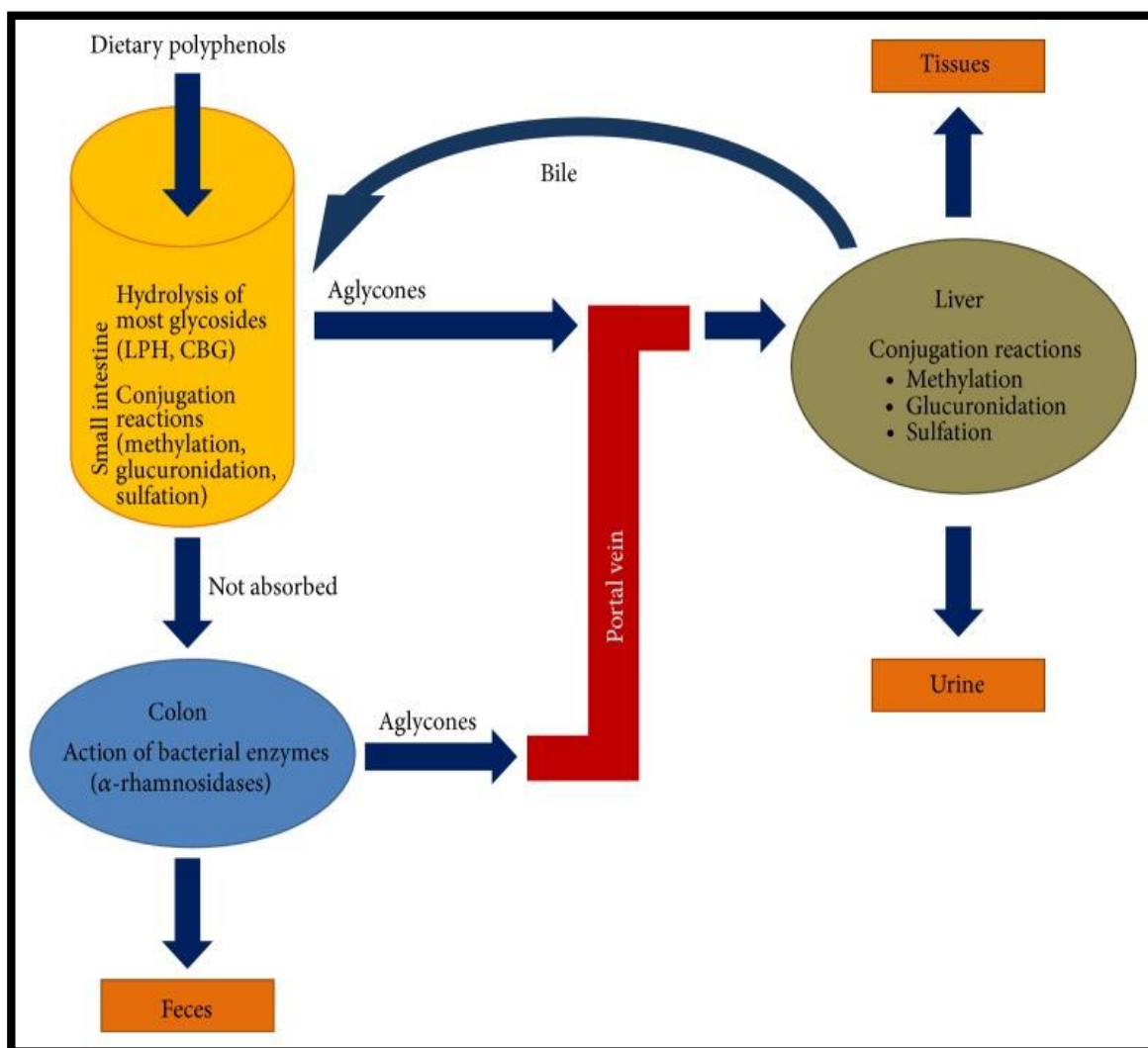


Figure 09: Routes of absorption and metabolism of dietary polyphenols and their derivatives in humans (Laura et al., 2015).

IV.4. Polyphenol effects in the consumer

Polyphenols are indeed endowed with several therapeutic, pharmaceutical, cosmetological and agri-food properties (Boumaza, 2012 ; Agarra, 2017). They play a very important role, mainly in the fight against cancers, cardiovascular diseases and lipid peroxidation. Explaining their great use in the manufacture of medicines (Wang et Brumaghim. 2011 ; Amrani et al., 2017; Azzouzi, 2017).

The effects of polyphenols on the body are numerous, and some are yet to be discovered. These effects will depend on the amount absorbed and the good distribution to the tissues or target cells.

IV.4.1 Anticancer effect

Phenolic compounds can activate natural mechanisms of cancer defense. Indeed, the early stages of the cancer initiation phase can be blocked by the ability of the target tissues to intercept and metabolize the mutagenic agents.

Cells such as hepatocytes, synthesize phase I enzymes (including monooxygenases, such as cytochromes P₄₅₀) are able to oxidize hydrophobic mutagenic substances into constituents of the phase II enzyme substrate (glucoronyl transferases, sulfotransferases ...), which transform these products into hydrolysable species easily excretable outside cells (Akroume, 2006). Phase I and II enzymes act similarly in the intestinal mucosa. They are synthesized under the polyphenolic compounds found in food (vegetables), as well as under the action of isothiocyanates, derived from glucosinolates (Moein, 2015).

The anticancer effects of polyphenols have been monitored in different tissues, including the mouth, stomach, duodenum, colon, liver, lungs and skin. Many polyphenols, such as quercetin, catechins, isoflavones, lignans, flavanones, ellagic acid, red wine polyphenols, resveratrol or curcumin, have shown protective effects in different cancer models (Cragg and Newman, 2005).

IV.4.2 Antioxidant effect

Polyphenols are able to trap free radicals and activate other antioxidants found in the body. This principle has been used in the manufacture of several drugs.

Protection against oxidative stress is the most well-known and documented effect of polyphenols. Because of their structure and charge, polyphenols bind readily to charged molecules and activate free radical removal processes such as the superoxide dismutase enzyme, and activate other antioxidants found in the body (Ozen, 2010 ; Ozen et al., 2011).

Flavonoids are also involved in the resistance to aluminum toxicity in corn. The roots of corn plants exposed to aluminum exuded high levels of phenolic compounds such as catechin and quercetin; indicating that their ability to chelate metals can be an *in vivo* mechanism for improving aluminum toxicity (Maria et al., 2012). Regular consumption of green tea for a long time can protect individuals from the negative consequences of oxidative stress produced during life (Lassed et al., 2017).

IV.4.3 Hepatoprotective effect

Polyphenols have a preventive effect against several diseases and liver damage. Certain phenolics such as cyanidin-3-O- β -glucoside (C3G) anthocyanins have been shown to increase the

expression of hepatic catalytic glutamate-cysteine ligase (Gclc) and, as a consequence, a decrease in ROS levels and pro-apoptotic signaling. In addition, C3G treatment lowers the peroxidation of hepatic lipids, inhibits the release of pro-inflammatory cytokines, and protects against the development of hepatic steatosis (Zhu et al., 2012). Silymarin derived from Milk Thistle is a flavonoid (extracted from seeds and fruits) that stimulates the enzymatic activity of DNA-dependent RNA polymerase 1 and the sequential biosynthesis of RNA, proteins and then DNA.

The literature has documented several phyto-pharmacological studies investigating the hepatopreventive potency of phenols originating from numerous botanical extracts, against different intoxication (Amrani et al., 2014; Boubekri et al., 2014; Djebbari et al 2017).

IV.4.4 Detoxifying effect of xenobiotics (pesticides)

There are nearly 150,000 molecules called xenobiotics, which means foreign to our biology, in the air we breathe, in the liquids we drink, in the foods we eat (Agarra, 2017). Our body defends itself by borders: bronchial and digestive skin and mucous membranes. The integrity of these borders is ensured by good nutrition, especially in fatty acid and polyphenols. But some xenobiotics such as pesticides can cross this defense barrier and pass into the blood, where they can then be stored in adipose tissue, liver or brain (Agarra, 2017).

Their neutralization in the liver is via phase I (oxidation-reduction reactions) and phase II (conjugation), under the action of phenolic compounds consumed (in the diet). The activation by iron of cytochrome P450 causes the emission of corrosive free radicals. Thus it is justified to calm the activity of these enzymes to avoid the damage caused by the intermediate substances of these reactions. This is possible with the polyphenols found in fruits and vegetables and green tea (Agarra, 2017). With the exception of naringenin, a phenol is a very potent cytochrome P450 inhibitor (a grapefruit polyphenol) (Moein, 2015 ; Agarra, 2017).

The liver produces a considerable amount of glutathione. It is the main detoxifier of the body. The latter is involved in both the Phase I and II processes and in the neutralization of toxicants in the blood. Glutathione plays a major role as a direct antioxidant and antitoxic, as a cofactor of glutathione peroxidase and glutathione transferases, in cytoprotection against oxidative stress and xenobiotics (Gebel, 2002). Green tea catechins are potent stimulators of glutathione transferases. The secondary metabolites of this detoxification are captured by glutathione and eliminated in the urine by the action of polyphenols (Figure 10).

Most polyphenols have protective effects against xenobiotics by induction of glutathione transferases, and in some cases inhibition of P₄₅₀ cytochromes (Kang et al., 2005). For example,

phenolic compounds found in green tea may be able to multiply by 10 the ability of glutathione to eliminate toxins in the urine (Tang et al., 2008).

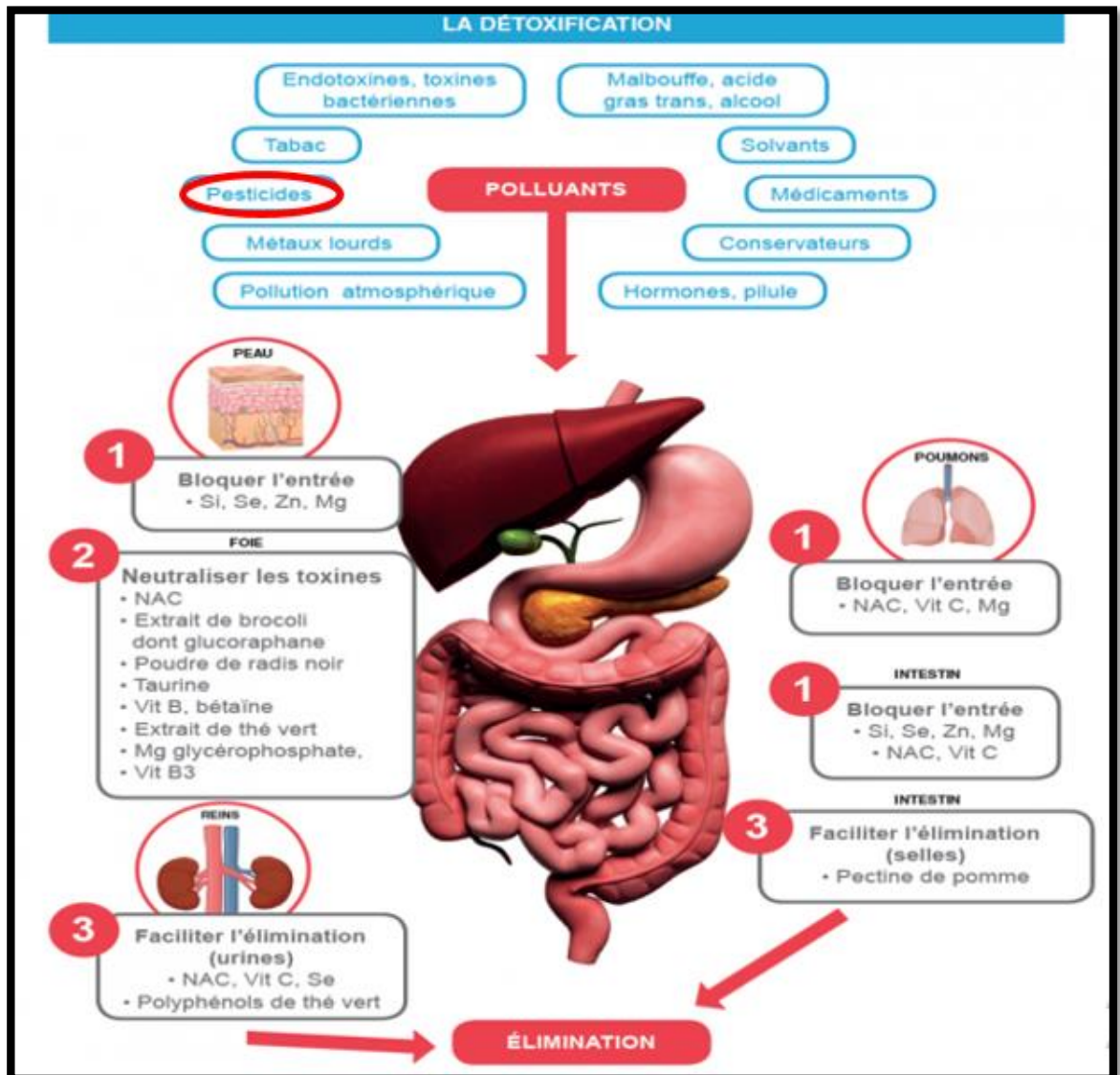


Figure 10: The interest of bioactive compounds and polyphenols in the detoxification of xenobiotics (Agarra, 2017).

1- Experimental studies

1.2- Experimental study of the plant: *Perralderia coronopifolia* Coss

I. Material and methods

1. Chemicals

The chemicals utilized in the tests were in analytical grade and purchased from Sigma–Aldrich and Roche.

2. Plant material

2.1 Plant 1 : *Perralderia coronopifolia* Coss

➤ Classification

Table 03: Systematic classification of the plant *P. coronopifolia* Coss.

Reign	Plantae
Branch	Tracheophyta
Class	Magnoliopsida
Order	Asterales
Family	Asteraceae
Kind	<i>Perralderia</i>
Species	<i>Perralderia coronopifolia</i>
Sub species	eu-coronopifolia M
Variety	tipyca M

- Traditional name: لحية التيس, Lahiet et-tis, Awarhad, Aouarhad, Aourhed, Tafr'a, Thafes, Tirghet, T'tafes
- Distribution: Saharan endemic species common to the northern and western Sahara, also present in Tassili des Ajjers.
- Description: Erect tufted plant with good leaves. Hairy, glandular and yellowish stems. The leaves are a little fleshy, divided into narrow strips. The flowers are all tube yellow to purple red. The bracts protrude more or less from the petals and are spread outwards. The

red achaines bear long hairs, the hairs of the outer egret are short, those of the internal egret are long, fragile and of unequal lengths. The height is 15 to 50 cm.

- In the flora of Ozenda, the species is mentioned to be yellow flowers, the variety *dessignyana* with purple flowers and leaves divided twice being specific to southern Oran and Morocco.
- Harvest: The plant material (*P. coronopifolia*) was collected in 2011 at an elevated region located around Taghit in the south-west of Algeria. It was authenticated by *Mr Mouhamed Ben Abdelhakem*, manager of the wildlife preserving organization of Bechar. A label sample (PCA0511-TAG-ALG-52) was put at the herbarium of VARENBIOMOL Unit, University Frère Mentouril, Constantine.
- Extraction: It is performed by *Dr Boussaha Sara* at the laboratory of Research Unit and Valuation of Natural Resources, Bioactive Molecules, Physicochemical and Biological Analyzes (VARENBIOMOL), Frères Mentouri 1 Constantine University. Constantine, Algeria.

A dried aerial parts (1400 g) of the plant were macerated for 48 h at room temperature with ethanol-H₂O (80:20, v/v), three often. The rest was concentrated and liquefied in 650 mL of H₂O, after filtration. The resultant mixture was treated by CHCl₃, ethyl acetate and n-butanol. The organic phases were dried over Na₂SO₄ and filtered by common filter paper and concentrated in vacuum at ambient temperature to get the chloroform (2 g), ethyl acetate (7 g) and n-butanol (40 g) extracts.

3. Animals

Young adult female Wistar Albino rats (n = 36, mean age = 48 ± 5 days) weighing 150 ± 18 g were used in this study. They were obtained from the OMUDEHAM Laboratory Animal Research Unit (Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey's Animal Ethics Committee). Ondokuz Mayıs University (Samsun-Turkey) has received ethical approval (OMUHAYDEK: B-30-2-ODM-0-20-09-00-050-04-32, 2015, April 18, 2015, see Annex). The animals were housed in cages, beaten in an air-conditioned room at a temperature of 22 to 26 °C and fed standard rat pellets with free access to food and water at will. The rats were acclimatized to the laboratory environment for two weeks before the start of the study. The European Community Directive (86/609 / EEC) and the national rules on animal care have been followed.

4. In vitro experimental study

4.1 Antioxidant properties

4.1.1 Determination of total phenolic and flavonoid contents

Polyphenols were measured by the Folin-Ciocalteus product according to the method described by Singleton et al. 1999 (Singleton et al., 1999). 100 μ L of Folin Ciocalteus reagent and 1.580 mL of distilled water were mixed with 20 μ L of sample. After 3-8 minutes, 0.3 mL of Na_2CO_3 was added. The absorbance of sample was read at 765 nm after 30 minutes of incubation at 37 °C. The total phenolic compounds concentration of extract was quantitated as μ g of gallic acid equivalent (GAE)/1 mg plant material.

Total flavonoids content was determined as described in a reference (Wang et al., 2008). 0.5 mL of sample was added to of AlCl_3 (2%; 0.5 mL). The absorbance of sample was read at 420 nm lasting 1 h of incubation. The Quercetin was used as a standard. The content of flavonoid compounds in extract was estimated as μ g of quercetin equivalent (QE) / 1 mg plant material.

4.1.2 Determination of Total Antioxidant Activity:

The activity of each extract was determined spectrophotometrically as mention in the phosphomolybdenum method (Prieto et al., 1999). This assay founded on the potent of reducing Mo (VI) to Mo (V) by the extract analyzed and the resulting of green phosphate/Mo(V) substances. The extract solution (0.3 mL) was mixed with 2.7 mL of the reagent solution prepared in ammonium molybdate (4 mM), sulfuric acid (0.6 M) and sodium phosphate (28 mM). The sample and standard solutions were left in a water bath at 95 ° C during 90 minutes. After cooling the samples to room temperature, the absorbance of the resulting green sample-phosphomolybdenum complex was read at 695 nm. For the blank, just a replacement of sample by 0.3 mL of ethanol. A typical blank solution contained 2.7 mL of reagent solution, after it was left under the similar conditions as samples. The activity was defined as the absorbance of the sample and standard. A higher absorbance value is indicative a higher antioxidant capacity.

4.1.3 Reducing Power Assay:

The reducing power of each extract and standard antioxidants was measured spectrophotometrically using the method of Oyaizu, 1986 (Oyaizu, 1986). This assay established on the reduction of the Fe^{+3} -ferricyanide to the Fe^{+2} , by the reductant compounds in the mixture. 1 mL of the sample solutions (50-500 μ g/mL) were added to 2.5 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide (1%; 2.5 mL). The mixtures were placed in a water bath at 50

°C pending 20 min. The mixtures were centrifuged at 1000 x g for 20min after adding of trichloroacetic acid (10%; 2.5 mL). Finally, the supernatant (2.5 mL) was added to 2.5 mL of distilled water and ferric chloride (0.5 mL; 0.1 %). The mixture intensity of the bleu-green color was read at 700 nm. In this assay, the upper absorbance of sample indicates better reducing power under the reaction conditions.

4.1.4 H₂O₂ scavenging assay:

H₂O₂ scavenging activity was measured as a slightly modification described by Zhao et al, 2006 (Zhao et al., 2006). 1 mL of sample was mixed with H₂O₂ (0.1 mM; 1 mL), ammonium molybdate (3 %; 100 µL), H₂SO₄ (2 M; 10 mL) and KI (1.8 M; 7 mL). Finally, the mixture was titrated using Na₂S₂O₃ (5 mM) till disappearing yellow color. The reaction without sample was used like a control. The percentage of scavenging effect was calculated using the formula given bellow:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ scavenging activity, \%} = [(V_{\text{control}} - V_{\text{test}}) / V_{\text{control}}] \times 100$$

Where V_{control} is the volume of Na₂S₂O₃ and V_{test} is the volume of Na₂S₂O₃ solution H₂O₂ added to the test samples.

4.1.5 Metal Chelating Activity

The Fe⁺² chelating activity of extracts and standard antioxidants was measured as a mentioned assay by Dinis et al (Dinis et al., 1994). The different concentrations (50-500 µg/mL) of the sample were added separately to 2 mM of FeCl₂ (0.05 mL) and left for incubation at room temperature for 5 min. The reaction was started by adding the ferrozine (5 mM; 0.3 mL). After shaking forcefully, the mixture was incubated at room temperature pending 10 min. EDTA was used as a positive control. Absorbance was read at 562 nm. The inhibition percentage of ferrozine-Fe⁺² complex creation was measured as the next formula:

$$\text{Chelating capacity (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Where A₀ is the absorbance of the Fe⁺²-ferrozine complex (control) and A₁ is the absorbance of the test solutions.

4.1.6 DPPH[·] scavenging assay

DPPH[·] scavenging assay was performed according to the method in the literature (Braca et al., 2001). 3 mL of a methanol solution of DPPH[·] were mixed with 1 mL of sample in various

concentrations (1 to 20 µg/mL). After 30 min incubation in the dark at room, absorbance was read at 517 nm. The inhibition percentage was determined using the formula:

$$\text{Inhibition, \%} = (1 - A_1 / A_0) \times 100$$

Where, A₀: Absorbance of the DPPH solution alone. A₁: Absorbance of the DPPH solution plus extract or vitamin C.

4.1.7 Hydroxyl radical (OH[·]) Scavenging assay

The capacity of extracts to trap the hydroxyl radical (OH[·]) was evaluated according to the method of the literature of Wang et al., (2008) with some modifications. In order to generate the hydroxyl radicals by Fenton reaction, 0.5 mL of FeSO₄ (8 mM) was mixed with 0.8 mL of H₂O₂ (6 mM). Then 0.5 mL of distilled water is added followed by increasing concentrations of the various extracts or vitamin C (1, 2.5, 10, 20 and 30 µg / mL) and 0.2 mL of sodium salicylate (6 mM). The samples were mixed and incubated at 37 ° C for 1 h. Absorbance was measured at 562 nm. Vitamin C was used as a positive control and the percentage of hydroxyl radical scavenging activity (OH[·]) (I %) was calculated using the following equation:

$$\text{Scavenging activity of hydroxyl radical\%} = [1 - (A_1 - A_0) / A_2] \times 100$$

Where: A₀: Absorbance of the control (without extract or vitamin C), A₁: Absorbance of the sample with the extract or vitamin C, A₂: Absorbance of the sample without sodium salicylate.

The median inhibitory concentrations (IC₅₀) of the various extracts and vitamin C were calculated from the equations of the linear trend curves obtained from the graphs of the percentage change in hydroxyl radical (OH[·]) (I%) inhibition. function of increasing concentrations of extracts and vitamin C

4.1.8 Inhibition of lipid peroxidation (LPO) assay

The ability of extracts to inhibit lipid peroxidation was evaluated according to the modified protocol of Cao and Ikeda, (2009) using egg yolk as a lipid-rich source. To 0.5 mL of 10% egg yolk homogenate, 50 µL of FeSO₄ (0.07 M) was added. The mixture was then incubated with increasing concentrations of the extracts or vitamin C (50, 100, 200, 300 and 400 µg / mL) at 37 ° C for 30 min. After incubation, 1 mL of 20% TCA (trichloroacetic acid) and 1.5 mL of 1% TBA (thiobarbituric acid) are successively added. The samples were mixed and then incubated a second time for 15 minutes at 95 ° C. After centrifugation of the samples at 400 g for 20 min, the resulting thiobarbituric reactive substances (TBARS) were measured in the supernatant at 532 nm. Vitamin

C was used as a positive control and percent inhibition of lipid peroxidation (I %) was calculated using the equation:

$$\text{Inhibition of lipid peroxidation (LPO) (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Where A_0 is the absorbance of control (without green tea extract or vitamin C) and A_1 is the absorbance of the sample plus extract or vitamin C.

The median inhibitory concentrations (IC_{50}) of the various extracts and vitamin C were calculated from the linear trend curve equations obtained from the graphs of the percentage change in lipid peroxidation inhibition (I%) in vitro. according to the increasing concentrations of extracts and vitamin C.

4.2 DNA Damage inhibition efficiency

DNA protection capacity of the test plant extracts was performed as described by Russo et al., (2001), using photolyzing 46966 plasmid DNA (extracted from *Echerichia coli*) through UV radiation in the presence of H_2O_2 and the performance of agarose gel electrophoresis with the irradiated DNA. 1 μ L aliquots of 46966 plasmid (20 μ g/mL) were put in polyethylene microcentrifuge tubes, then 50 μ g of each plant extract were added to single tube. One tube does not contain extract is served as an irradiated control (C_R). Then, 4 μ L of H_2O_2 (3 %) was added into tubes (including C_R). Lastly, tubes were put on the outer face of a UV transilluminator (300 nm) and irradiated at room temperature during 10 mn. Individual tube contains 1 μ L aliquots of 46966 plasmid DNA was placed also, which performed as the non-irradiated control (CO). Samples were run on agarose gel (1%) and photographed using a Lourmat gel imaging system (Vilber).

4.3 Cell culture

4.3.1 Culture preparation

HeLa (human cervix carcinoma) and C6 (rat brain tumor) cells were developed in DMEM-HG (Dulbecco's modified eagle's medium) with 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum) and 2 % Penicilin/streptomycin solution, at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO_2 at Plant Research Laboratory, Department of Chemistry, University of Cankiri Karatekin, Turkey.

HeLa and C6 cells were detached from bottom of the culture flask using 10 mL Trypsin-EDTA mixture. After detaching, the same volume of culture medium was placed in the flask and mixed thoroughly and put in centrifuge 600 tours during 5 min (Nüve NF 800, Turkey). 5 mL of

medium was mixed carefully with the supernatant. The concentration of cells in this suspension was determined using CEDEX HIRES Cell Counter.

4.3.2 Anticancer activity test

The xCELLigence RTCA-SP (Real Time Cell Analyzer-Single Plate) instrument is a grouping of four parts: An E-Plate 96, a Plate station, an Analyzer and a computer including RTCA software. It is used to evaluate the anti-proliferative effects of *n*-butanol and ethyl acetate extracts of *P. coronopifolia* on HeLa and C6 cells.

50 μ L of the medium was placed to every well of E-Plate 96 and left in the sterile cabinet for 15 min, then incubated for 15 min. 100 μ L of the cell suspension ($2,5 \times 10^4$ cells/100 μ L) was placed into wells. Exceptionally, 100 μ L of 5-florourasil (5-FU) was added as a control in the last wells. The plate incubated in the hood for 30 min in order to adhere cells to the bottom, then attached to xCELLigence RTCA-SP station in the incubator. A measurement during 80 min was started. The extract solutions (250, 100 and 50 μ g/mL) in DMSO were injected to the wells and adjusted until 200 μ L using culture medium. The control and medium wells does not have any extract solutions. Lastly, the plate was placed in the incubator xCELLigence instrument and measurements were taken over 48 hours.

4.3.3 Cell proliferation assay

cells were plated in 96-well culture plates (COSTAR, Corning, USA) at a density of 30.000 cells per well. Vehicle (DMSO), 5-fluorouracil, cisplatin and several samples in various concentrations (5-100 μ g/mL) were added to each well. Cells were then incubated overnight before applying the BrdU Cell Proliferation ELISA assay reagent (Roche, Germany) according to the manufacturer's procedure. Briefly, cells were pulsed with BrdU labeling reagent for 4 h followed by fixation in FixDenat solution for 30 min at room temperature. Thereafter, cells were incubated with 1:100 dilution of anti- BrdU-POD for 1.30 h at room temperature.

The amount of cell proliferation was assessed by determining the absorbance (A) at 450 nm of the culture media after addition of the substrate solution by using a microplate reader (Ryto, China). Results were reported as percentage of the inhibition of cell proliferation, where the optical density measured from vehicle-treated cells was considered to be 100% of proliferation. All assays were repeated at least twice using against HeLa and C6 cells. Percentage of inhibition of cell proliferation was calculated as follows:

$$\% = [1 - (A_{\text{treatments}} / A_{\text{vehicle control}})] \times 100$$

Stock solution of the samples, 5-fluorouracil were solved in sterile DMSO and diluted Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; 1:20). DMSO final concentration is below 1% in all tests.

4.3.4 Lactate Dehydrogenase (LDH) leakage assay

LDH leakage assay was carried out using LDH cytotoxicity detection kit by Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany according to protocol in the user's manual. At 100 concentration that was the highest dose at antiproliferative activity test were determined cytotoxicity (%) against C6 cell line. 5-FU were used as positive control. Samples and 5-FU were incubated with 100 μ l of C6 cell suspension having 5×10^3 cell/ml in 96 well plate at 37°C for overnight in 5% CO₂ atmosphere. All the control and tested substances were tested in triplicates and twice and mean \pm SEM of the absorbance value were taken to calculate cytotoxicity.

$$\text{Cytotoxicity \%} = (\text{Triplicate absorbance} - \text{low control}) / (\text{High control} - \text{low control}) \times 100$$

5. In vivo experimental study

These study was performed using the *n*-butanol plant extract of *P. coronopifolia* (*n*-BuOH-PC), PCP was used as xenobiotic which induced toxicity. Vitamin E was used as positive control.

5.1 Animals treatment

PCP (20 mg / kg body weight) and / or the *n*-butanol plant extract (50 mg / kg body weight) was administered daily by gavage for two weeks. Vitamin E is used as a positive control with a dose of 100 mg / kg per peritoneal injection. Rats were randomly divided into six groups:

- ✓ Group I (n = 6) was served as a negative control.
- ✓ Group II (n = 6) received 20 mg PCP / kg body weight for two weeks.
- ✓ Group III (n = 6) received the plant extract at 50 mg / kg (EXT50) for two weeks.
- ✓ Group IV (n = 6) was treated with plant extract and PCP (EXT50 + PCP) for two weeks.
- ✓ Group V (n = 6) was treated with vitamin E (VIT) at 100 mg / kg for two weeks, this group was designated as a positive control group.
- ✓ Group VI (n = 6) was treated with vitamin E at 100 mg / kg and PCP at 20 mg / kg (VITE + PCP) for two weeks.

The measurement of body mass variation was followed during the experiment. The animals were weighed every morning during the two weeks of treatment. The recorded results allowed to evaluate progressively the variation of the body weight of rats.

1. Preparation of homogenate tissue:

Animals were not fed overnight at the end of two weeks and were immediately perfused with 0.9% NaCl (+4 °C) to immediately remove blood due to the diurnal variation. Blood collection is performed from the portal vein into heparin tubes. The rats are anesthetized with an injection of ketamine hydrochloride (1 mL / 100 mg) and xylazine (1 mL / 23.32 mg).

After dissection of the animals, the organs (livers, kidneys and heart) are removed, freed of excess fat, dried with filter paper and weighed beforehand (to evaluate the variation of their weight). Then, the livers were homogenized with 15% cold KCl to make a homogenate of 20%.

Prepared homogenates and collected blood are centrifuged at 9000 rpm for 15 min at 4°C, it's important to separate the supernatant. These supernatant was used for analyses of all antioxidant enzymes and kept a refrigerator at -80 °C for further analysis. The protein content in supernatant was determined calorimetrically as described in by Lowry et al, 1951 and measured at 660 nm. BSA (bovine serum albumin) was used as a standard.

2. Malondialdehyde (MDA) measurement

Lipid peroxidation progression is resolute in supernatant of all homogenates. It was evaluated by measuring the formation of TBARS via colorimetric method of Uchiyama and Mihara (1978). In this experiment, 3 mL of 1 % phosphoric acid and 1 mL of 0.67 % thiobarbituric acid (TBA). Aqueous solution was added to 0.5 mL of homogenate (20 %) and moved in centrifuge tube. The mixture was left in boiling water bath for 45 min, and then it was cooled to room temperature. 4 mL of *n*-butanol was added to the mixture and mixed forcefully. Absorbance was read at 532 nm after separation of the *n*-butanol phase by centrifugation. MDA was employed singly as standard. The TBARS content in liver homogenate was given per g of tissue.

3. Glutathione measurement

Reduced glutathione (GSH) content in each liver homogenate was tested chemically via Ellman's reagent as reported by Ellman, 1959. The basis of this analyse is the reactive cleavage of 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) by sulfhydryl group and resulting a yellow colour with great absorbance at 412 nm against reagent blank with not any homogenate. The GSH content in each liver homogenate was given per g of tissue.

4. Evaluation of GPx activity

The determination of GPx capacity in our liver homogenate was performed as designated by Flohe and Gunzler, 1984. In the existence of GSH, GPx causes the H₂O₂ reduction in the medium. Briefly 0.2 mL of supernatant disjointed from homogenate was added to 0.4 mL GSH (0.1 mM) and 0.2 mL TBS solution (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH: 7.4), and then tubes were mixed and incubated 5 min at 25 °C. 0.2 mL of H₂O₂ (1.3 mM) was added to the mixture. After 10 min, 1 mL trichloroacetic acid (TCA 1 %, w/v) was added in order to end the reaction. Then, the tubes were kept at 0-5 °C in an ice bath for 30min. After centrifugation for 10 min at 3000 rpm, 0.48 mL of supernatant was taken and added to each tube. 2.2 mL TBS solution and 0.32 mL DTNB (1 mM) were added 5 min before the measurement of the optical density at 412 nm. The antioxidant enzyme (GPx) action was given per mg of protein.

5. Dosage of biochemical parameters:

The clear serum supernatant was used for analysis of glutamates oxaloacetate transaminases and glutamate pyruvate transaminases (AST and ALT), cholesterol, triglycerides, total bilirubin, urea and creatin. These parameters analysed with Audit Diagnostics Instrument, Ireland. Biochemical parameters were carried out using kits obtained at the Faculty of Veterinary Medicine of Ondokuz Mayis University, Samsun, Turkey.

6. Statistical Analysis

All studies were performed in each test in triplicate. The data can be obtained on average \pm standard deviation of the mean (SDM). The analyses were performed by the SPSS 18(Statistical Package for the Social Sciences) software and evaluated by a T-test. The $p < 0.01$ and $p < 0.05$ values were considered significant.

The results of cell culture investigations are the means \pm SEM of six measurements for each cell type. Differences between treatment groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and p values < 0.01 and 0.05 were considered statistically significant.

II. Results and discussion

1. Results of the *in vitro* experimental study

1.1 Antioxidant activity

1.1.1 The content of total phenolic compounds and flavonoids

Assay results of the polyphenol-contents in the extracts of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC, *n*-BuOH-PC) reveal that these extracts contain high amounts of phenolic compounds, presented in μg gallic acid equivalent (GAE) per mg of plant material. The EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC extracts contain 444 ± 0.89 and 424.67 ± 4.03 μg GAE / mg of extract, respectively (Figure11).

On the other hand, the quantitative evaluation of the flavonoids has shown that the EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC extracts contain significant quantities of the flavonoids, presented in μg equivalents of quercetin (QE) per mg of plant material. The EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC respectively contain 400.33 ± 0.51 and 347.67 ± 2.25 μg EQ / mg of extract (Figure 11).

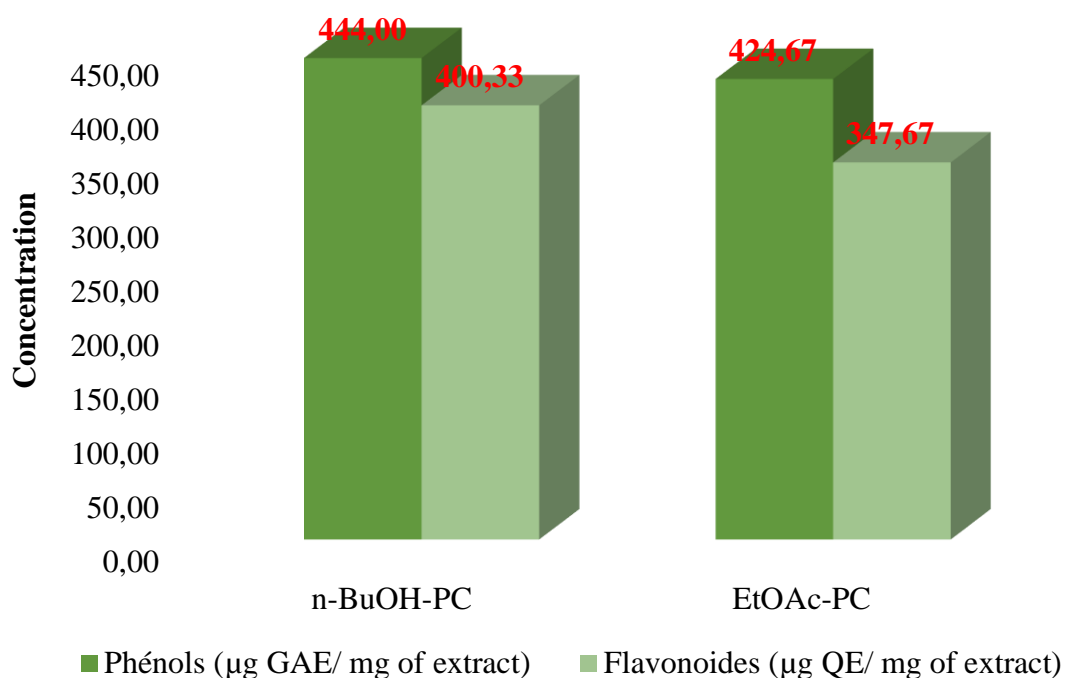


Figure 11: Total content of the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of the *P. coronopifolia* plant (EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC) in phenols and flavonoids.

The values are mean \pm standard deviation (n = 3)

1.1.2 Total antioxidant activity

Extracts of the plant *P. coronopifolia* (EtOAc-PC *n*-BuOH-PC) have a total antioxidant activity greater than the antioxidant standards used as positive controls: vitamin C and BHA (Table 04).

1.1.3 Reducing power

Extracts of the plant *P. coronopifolia* (EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC) have a stronger reducing power comparable to those of the antioxidant standards used as positive controls: trolox, BHA and vitamin C (Table 04). It is increased significantly with high concentrations ($p < 0.05$).

1.1.4 H₂O₂ scavenging activity

Extracts of the plant *P. coronopifolia* (EtOAc-PC *n*-BuOH-PC) have H₂O₂ scavenging activity higher than some standard antioxidants: trolox, BHA and vitamin E ($p < 0.05$) (Table 04).

1.1.5 Metal chelating activity

An extended reading of the results reported in the table allows to highlight the antioxidant activities of the extracts of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC; *n*-BuOH-PC) by determining their chelating power of metals. They have a chelating activity of metals higher than that of BHA and vitamin C at 100 µg / mL and 250 µg / mL (Table 04).

Table 04: Total antioxidant activity, reducing power, free radical scavenging, hydrogen peroxide scavenging and metal chelating activity of ethyl acetate and *n*-butanolic extracts of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC) using antioxidant standards as positive controls: EDTA, trolox, BHA, vitamin C and vitamin E. Values are means \pm standard deviation. ($n = 6$).

Simple	antioxydant activity			
	3 µg MI ⁻¹	100 µg MI ⁻¹	250 µg MI ⁻¹	500 µg MI ⁻¹
Total antioxidant activity , 695 nm				
<i>n</i>-BuOH-PC	0.034 \pm 0.008*	0.243 \pm 0.014	1.456 \pm 0.064**	2.982 \pm 0.103*
EtOAc-PC	0.04 \pm 0.02	0.27 \pm 0.02	1.23 \pm 0.09*	2.84 \pm 0.03*
Vitamine C	0.042 \pm 0.020	0.294 \pm 0.013	0.999 \pm 0.065	2.699 \pm 0.019
BHA	0.074 \pm 0.009	0.193 \pm 0.021	0.683 \pm 0.024	1.511 \pm 0.056
Reducing power, 700 nm				
<i>n</i>-BuOH-PC	0.155 \pm 0.009*	0.107 \pm 0.005	0.209 \pm 0.011**	0.388 \pm 0.008***
EtOAc-PC	0.30 \pm 0.01	0.47 \pm 0.01	1.14 \pm 0.02	1.93 \pm 0.09
Vitamine C	0.545 \pm 0.005	1.129 \pm 0.030	3.496 \pm 0.211	3.817 \pm 0.049
BHA	0.336 \pm 0.014	0.587 \pm 0.015	1.158 \pm 0.129	3.496 \pm 0.047

Trolox	0.192±0.009	0.373±0.010	0.914±0.048	1.880±0.096
H₂O₂ scavenging activity, %				
<i>n</i>-BuOH-PC	31.74±3.16	38.88±2.69	47.61±0.87	65.57±0.53
EtOAc-PC	22.22± 3.51	33.33±4.26*	42.06±1.23*	50.79±2.46
Vitamine C	17.46±0.75	34.09±2.08	53.96±0.94	66.66±0.57
Vitamine E	30.15±0.94	38.09±0.96	47.61±3.64	55.56±0.82
BHA	25.39±3.23	41.26±3.85	50.79±4.07	60.31±3.82
Trolox	31.70±2.05	41.25±0.77	46.03±2.67	50.79±0.62
Metal chelating activity, %				
<i>n</i>-BuOH-PC	7.87±1.34	29.21±0.67*	41.70±2.04*	50.94±1.21
EtOAc-PC	8.11±0.6	28.59±2.12*	41.82±1.51*	48.19±1.6
EDTA	10.24±1.34	21.85±0.67	37.45±3.04	45.94±1.21
Vitamine C	6.49±2.71	10.61±0.51	23.22±1.16	40.57±0.77
Vitamine E	6.24±1.27	8.86±1.84	20.22±2.07	23.60±3.16
BHA	2.12±0.39	21.10±0.70	36.83±3.67	52.56±1.84

* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared to antioxidant standards. BHA: butylated hydroxyanisole. EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic acid. Vitamin C (2.7) and BHA (1.5).

1.1.6 DPPH' scavenging activity

DPPH' trapping capacity measurements were performed in EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC extracts as well as in vitamin C (ascorbic acid) as a radical scavenger (antioxidant standard). The results obtained by this test allows to draw the graphs of the variation of the percentage of inhibition depending on the concentration for the different extracts (figure 12 and 13).

These curves show that the anti-radical activities of the EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC extracts with respect to the DPPH' radical are very important during the treatment of the samples by increasing concentrations. This method shows that these extracts are potent antioxidants with a dose-dependent decrease in the DPPH' radical. That is, the percent reduction increases with the increase in the concentration of the extracts to a threshold where the percent inhibition is stabilized with the increase in concentration. These curves also allows to draw real observations identified in the following points:

Extracts of the plant *P. coronopifolia* (EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC) have:

- ✓ A higher anti-radical power (90%) observed with a dose of 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of each extract; the same power as vitamin C (94%) at the same concentration.
- ✓ A scavenging power of 50% of the DPPH radicals with only a dose of 07 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of each extract. This activity is important compared to that obtained with vitamin C under the same conditions (5 $\mu\text{g} / \text{mL}$).
- ✓ The anti-radical power very close to that of vitamin C.
- ✓ A significant dose-dependent inhibition of the DPPH radical.

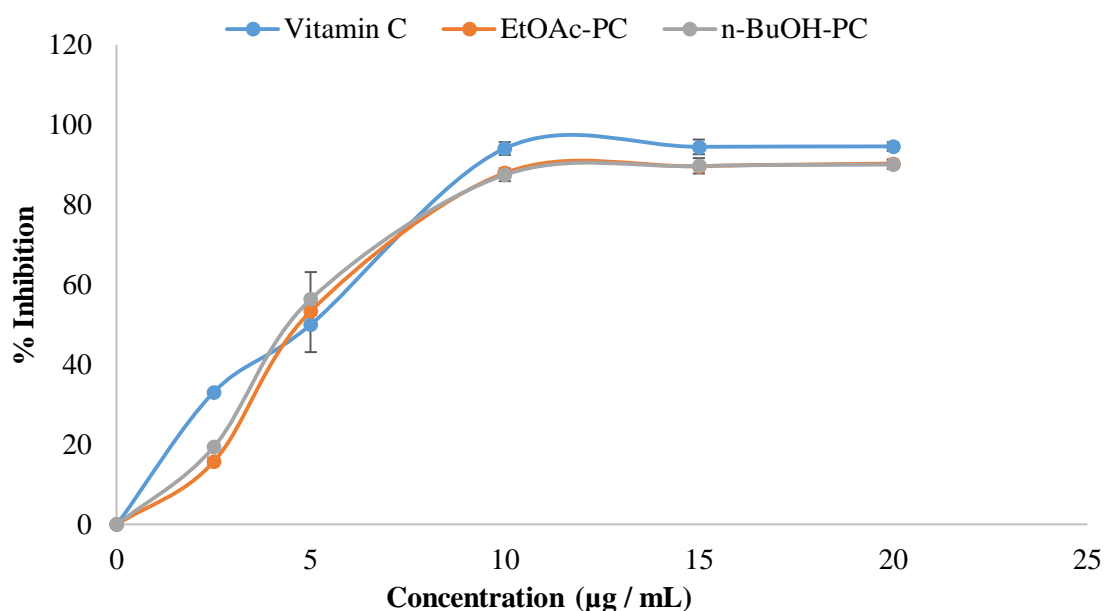


Figure12: Curves representing % inhibition of DPPH \cdot of ethyl acetate and *n*-butanolic extracts of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC; *n*-BuOH-PC) as well as vitamin C (antioxidant standard) as a function of concentration.

The values are mean \pm standard deviation ($n = 3$).

The concentration of an extract or standard causing 50% inhibition of DPPH \cdot (IC_{50}) is calculated graphically from the regression lines for each extract and is illustrated in the figure. Extracts of the plant *P. coronopifolia* (EtOAc-PC; *n*-BuOH-PC) seem to have the most potent inhibitory effect on the DPPH \cdot radical with median inhibitory concentrations in the order of IC_{50}

of vitamin C > IC_{50} *n*-BuOH-PC \geq IC_{50} of EtOAc-PC with IC_{50} values respectively of: 05 ± 0.10 $\mu\text{g} / \text{mL}$; 07.01 ± 0.02 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 07.02 ± 0.028 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

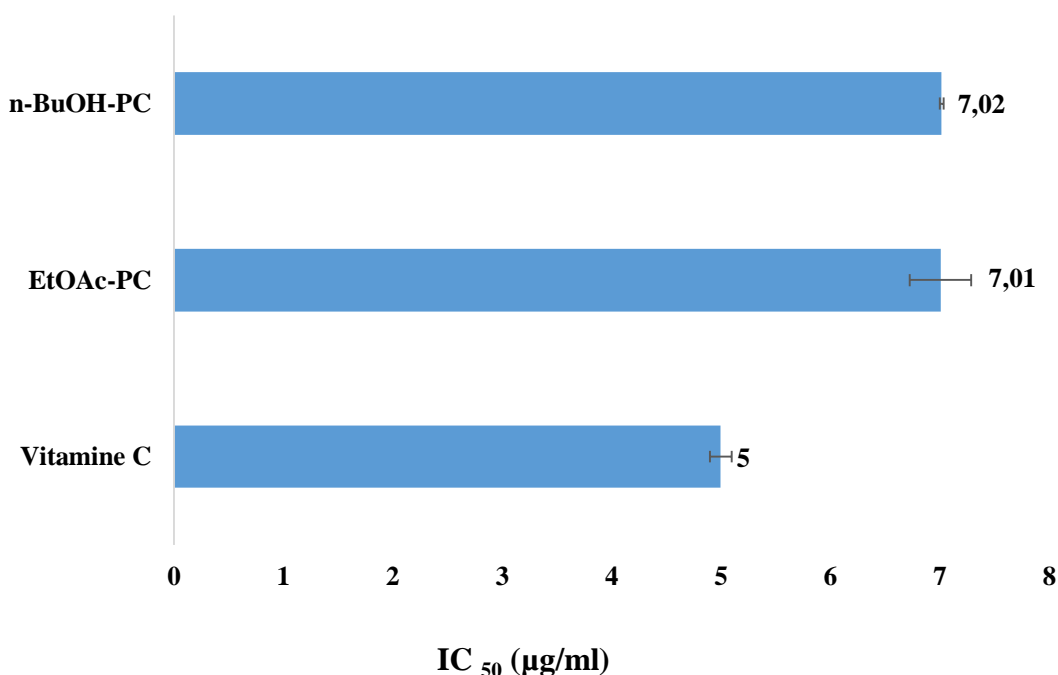


Figure 13: IC_{50} values of ethyl acetate and *n*-butanolic extracts of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC; *n*-BuOH-PC) and vitamin C against DPPH radical scavenging.

The values are mean \pm standard deviation ($n = 3$).

1.1.7 Hydroxyl radical (OH^{\cdot}) scavenging activity

The capacity of the plant extracts (EtOAc-PC, *n*-BuOH-PC) to trap the radical hydroxyl (OH^{\cdot}) is also evaluated. The results obtained by this parameter allows to draw the histograms of the variation of the percentage of inhibition illustrated in the figure 14. These later show that the various extracts have a very high antioxidant activity against this free radical. At a dose of $100 \mu\text{g} / \text{mL}$, the EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC extracts have a higher anti-radical content respectively of 70.9% and 70.53%. Vitamin C has a 98% inhibition with a dose of $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ under the same conditions.

The extracts have a significantly high neutralizing power of the hydroxyl radicals formed by the Fenton reaction in the reactive medium and this observed effect is dose-dependent. The median inhibitory concentrations are 11.17 ± 0.01 ; 14.59 ± 0.11 and $24.77 \pm 1.24 \mu\text{g} / \text{mL}$ of sample for vitamin C, EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC, respectively. This anti-radical activity of different extracts

is very high compared to that obtained with vitamin C under the same conditions (figure 15). A dose-dependent inhibition of OH[·] was also determined with all the extracts.

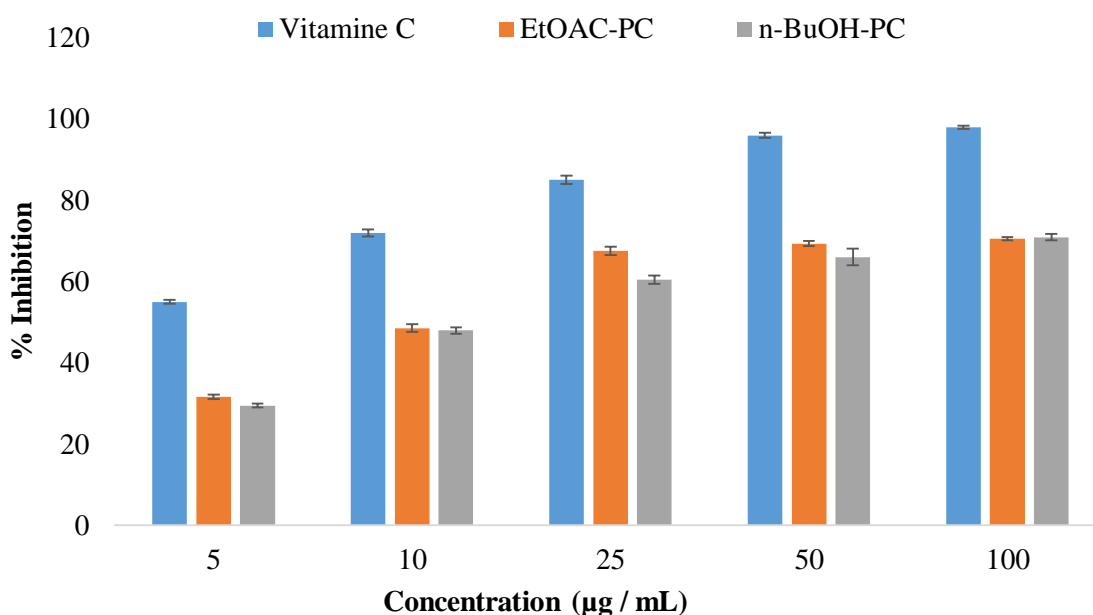


Figure 14: Hydroxyl radical (OH[·]) scavenging activity of the ethyl acetate and *n*-butanolic extracts of the plant *P. coronopifolia* (EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC) as well as vitamin C (antioxidant standard). The values are mean ± standard deviation (n = 3).

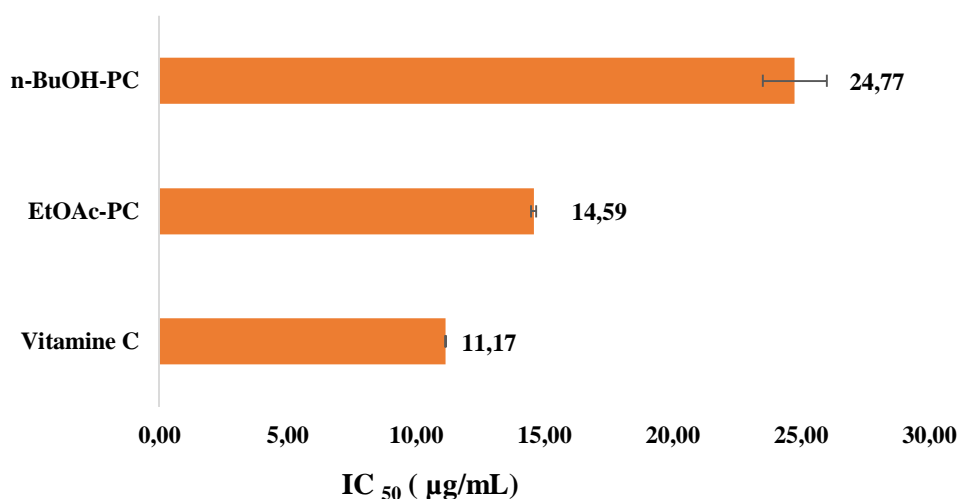


Figure 15: IC₅₀ values of ethyl acetate and *n*-butanolic extracts of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC; *n*-BuOH-PC) and vitamin C against hydroxyl radical scavenging (OH[·]). The values are mean ± standard deviation (n = 3).

1.1.8 The inhibitory power of lipid peroxidation

The inhibitory power of lipid peroxidation (non-enzymatic) of extracts (EtOAc-PC; *n*-BuOH-PC) is tested in egg yolk homogenate by FeSO₄ is evaluated by contribution to vitamin C (an antioxidant standard). The results obtained are illustrated in the figure 16.

These results show that the different extracts analyzed by this parameter have a very important capacity to inhibit lipid peroxidation. Under the same conditions and at a dose of 200 µg / mL, this inhibition capacity is: 97.90%; 83.36%; 82. 37% for vitamin C, EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC, respectively.

These results also allow to draw the median inhibitory concentrations (IC₅₀) of each extract and put them in comparison with that of vitamin C. The IC₅₀ are unveiled and shown in the figure 17. The extracts of the plant *P. coronopifolia* (EtOAc-PC, *n*-BuOH-PC) showed significantly interesting IC₅₀ of 79.09 ± 5.61 and 95.62±1.74 µg/mL, respectively.

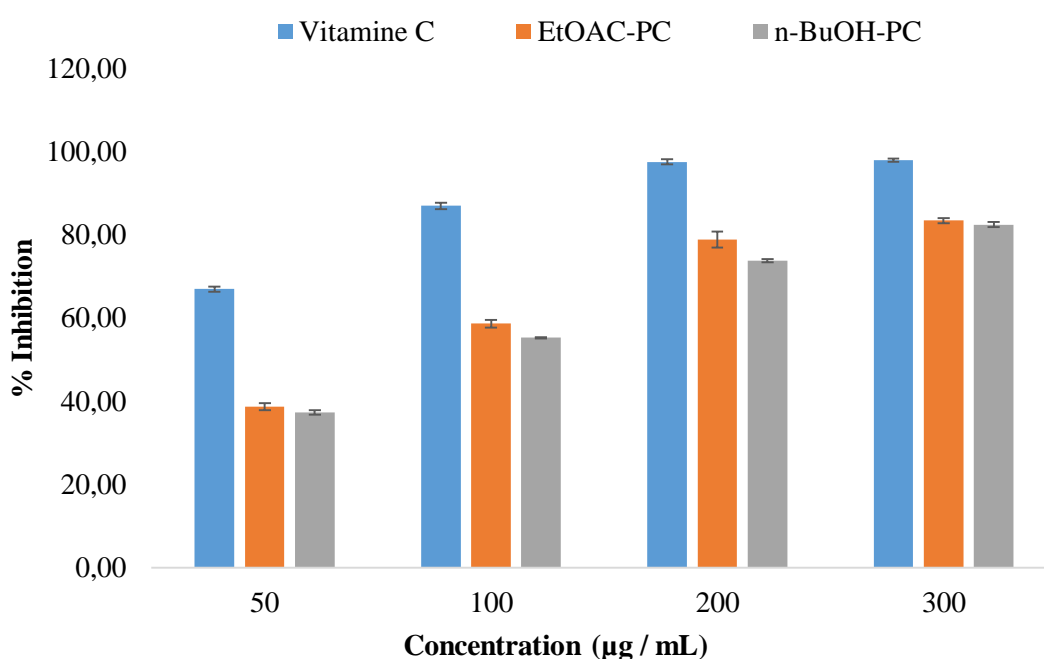


Figure 16: Inhibitory activity of lipid peroxidation (formation of MDA) of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *P. coronopifolia* plant (EtOAc-PC; *n*-BuOH-PC) as well as vitamin C (antioxidant standard). The values are mean ± standard deviation (n = 3).

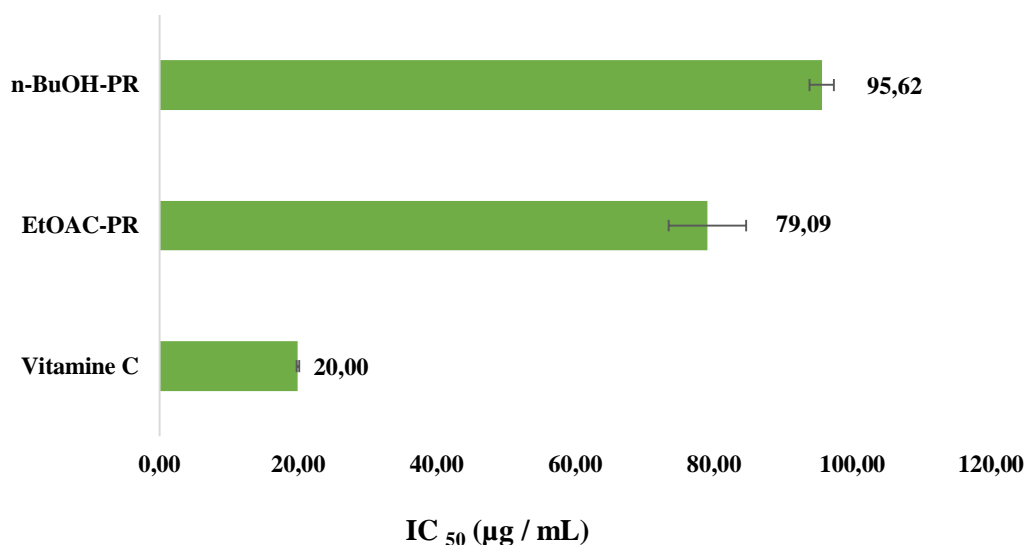


Figure 17: IC₅₀ values of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC; *n*-BuOH-PC) and vitamin C vis-à-vis the inhibition of lipid peroxidation.

The values are mean ± standard deviation (n = 3).

1.2 Efficacy of inhibition of DNA damage

The results of this test showed that EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC extracts at a dose of 50 µg had a complete protection of the plasmid DNA, by presenting a single band in the agarose gel electrophoresis, identical to that obtained with the non-irradiated control sample (C₀). The circular form (C) of the untreated DNA was converted to cut form: relaxed (R) and / or linear (L), indicating the damage of the plasmid DNA. While post-treatment with these extracts found the DNA in its native circular form (Figure 18).

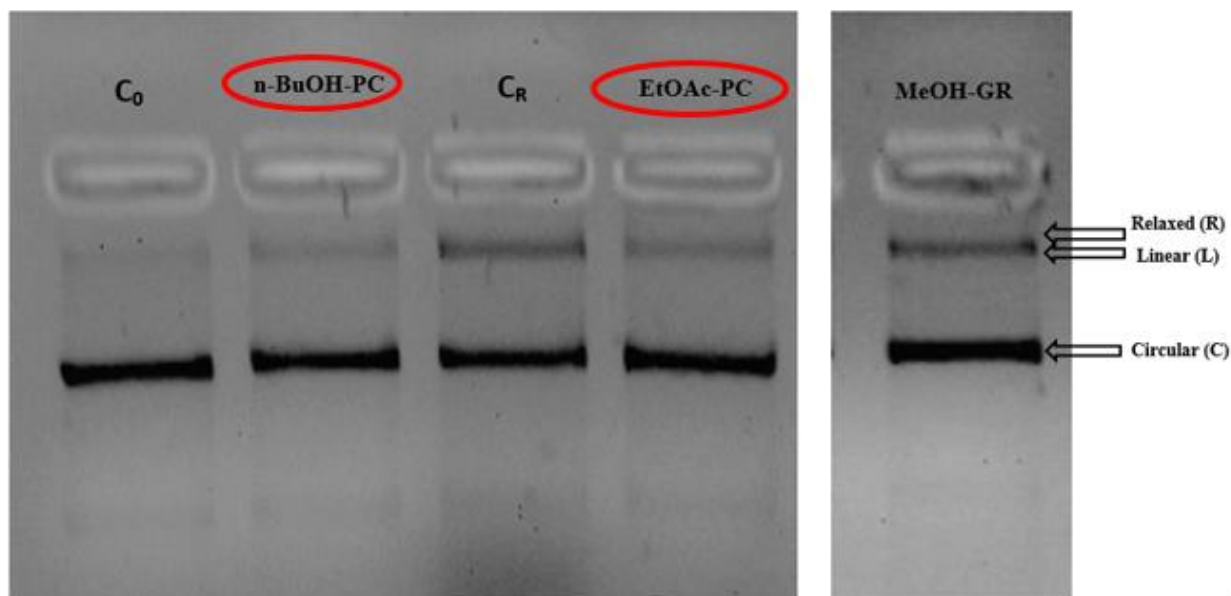


Figure 18: Effect of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of the *P. coronopifolia* plant (*n*-BuOH-PC and EtOAc-PC) (50 μ g) against oxidative damage to plasmid DNA 46966 caused by UV photolysis of H₂O₂ (3%, v / v). C₀ = untreated DNA. EtOAc-PC = UV irradiated DNA treated with EtOAc-PC extract, *n*-BuOH-PC = UV irradiated DNA treated with *n*-BuOH-PC extract, C_R = DNA not irradiated with UV.

1.3 Anticancer properties

1.3.1 Determination of the anticancer activity using the xCELLigence instrument

The results of the anti-cancer test against HeLa cancer cells are shown in figures 19, 20 and 21 with deflection bars of EtOAc-PC, *n*-BuOH-PC and 5-Fluorouracil (5-FU), respectively. Figures 24, 25 and 26 show the results of the anti-cancer test against C6 cancer cells, with deflection bars of: EtOAc-PC, *n*-BuOH-PC and 5-FU, respectively.

During the first two hours, untreated cells with extracts were observed in normal growth, but in a nutrient medium had no increase. Then, the EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC extracts were added to the cell culture medium of each well of E-plate 96. They have a higher activity with the concentration of 250 μ g / mL against both cells about 50 hours after treatment, while at other concentrations (100 μ g / mL and 50 μ g / mL), they show very low activity, almost the same with control during the same period

The profiles also showed differences at various times. Low concentrations showed some activities against HeLa cells at 15 h (figures 19 and 20) and against C6 cells at 31 h (figures 22 and 23) after post-treatment, but after a few hours they lost their ability of inhibition.

Each substance was triplicate tested twice against cell lines using the xCELLigence RTCA instrument. As can be seen in the diagram, several concentrations of extract were applied to the cells and each color represents a different concentration (—250 $\mu\text{g/mL}$, —100 $\mu\text{g/mL}$, —50 $\mu\text{g/mL}$, —Control, —Medium).

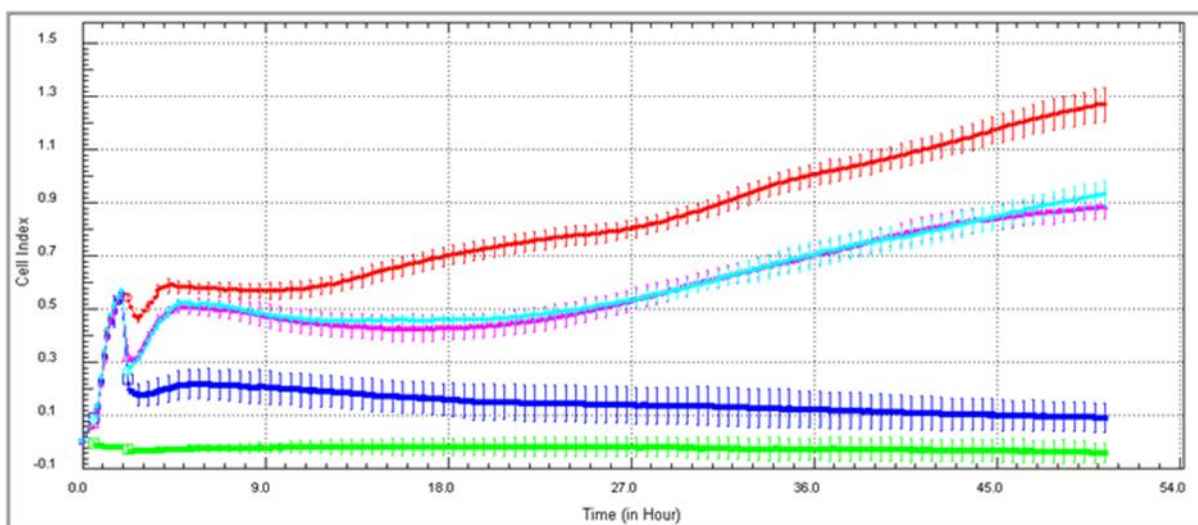


Figure 19: Anticancer activity of the ethyl acetate extract of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC) against the HeLa cell line (2.5×10^4 cells / well).

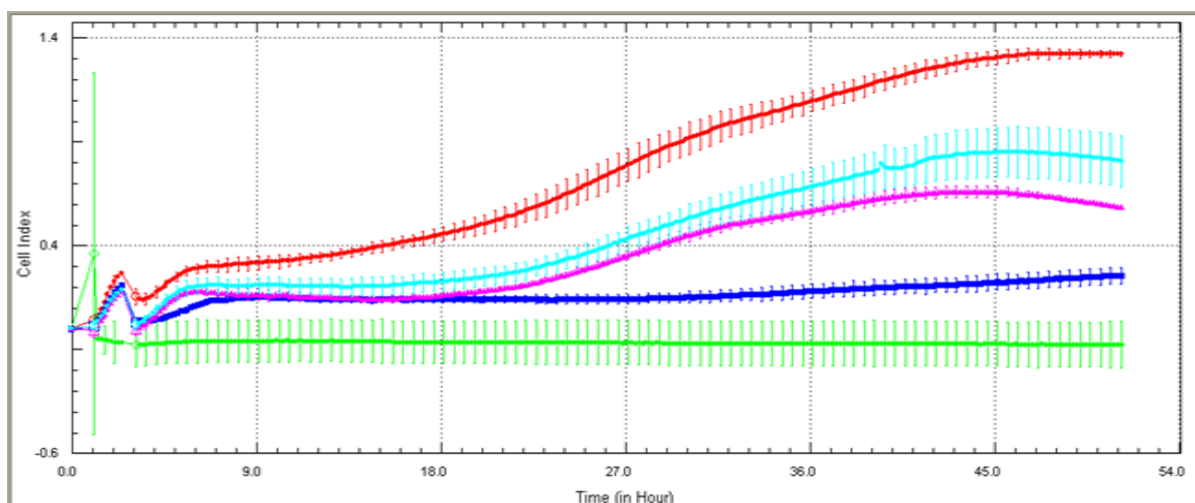


Figure 20: Anticancer activity of the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* (n-BuOH-PC) against the HeLa cell line (2.5×10^4 cells / well).

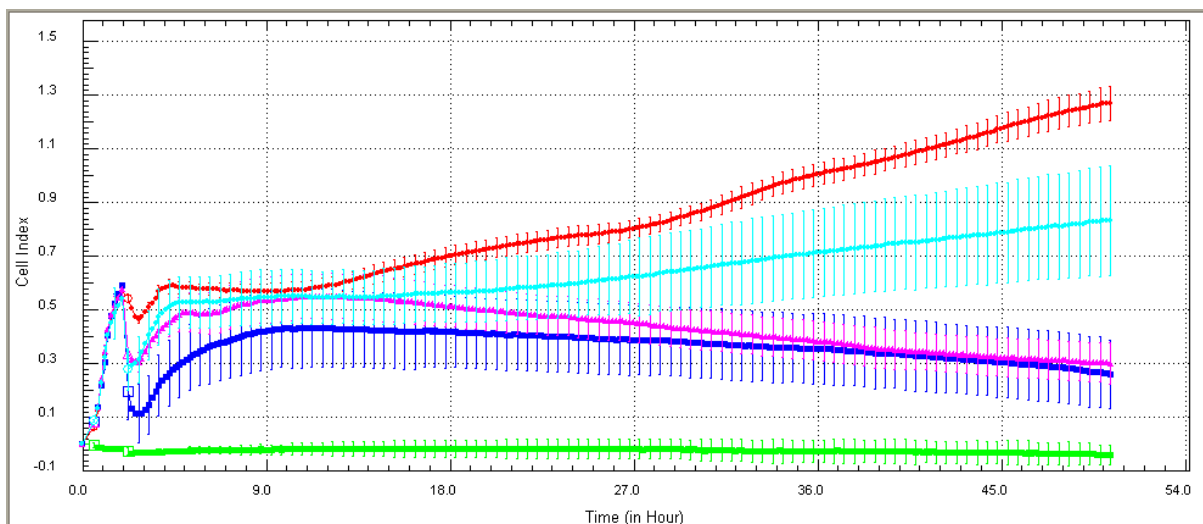


Figure 21: Anticancer activity of 5-fluorouracil as a positive control against HeLa cell line (2.5×10^4 cells / well).

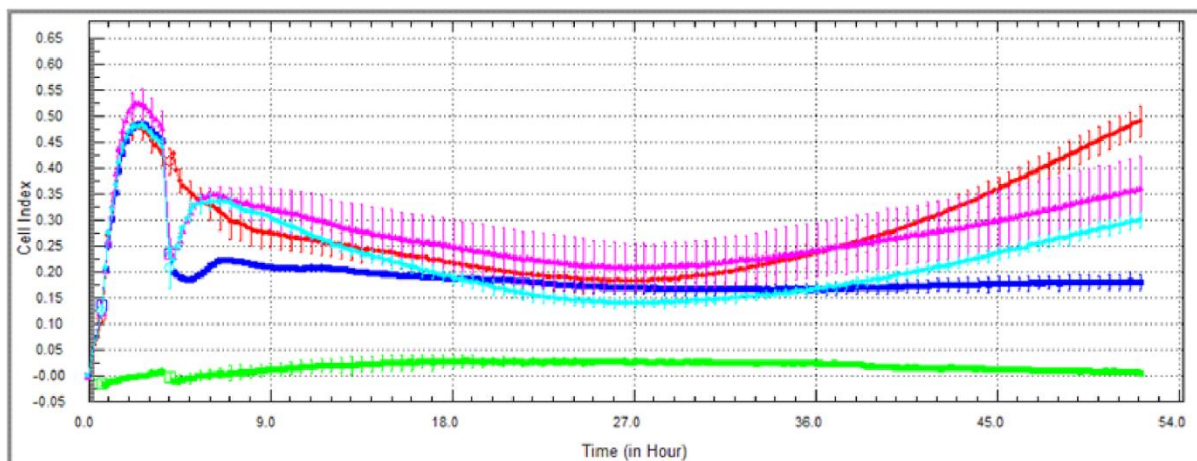


Figure 22: Anticancer activity of the extract of *P. coronopifolia* ethyl acetate (EtOAc-PC) against the cell line C6 (2.5×10^4 cells / well).

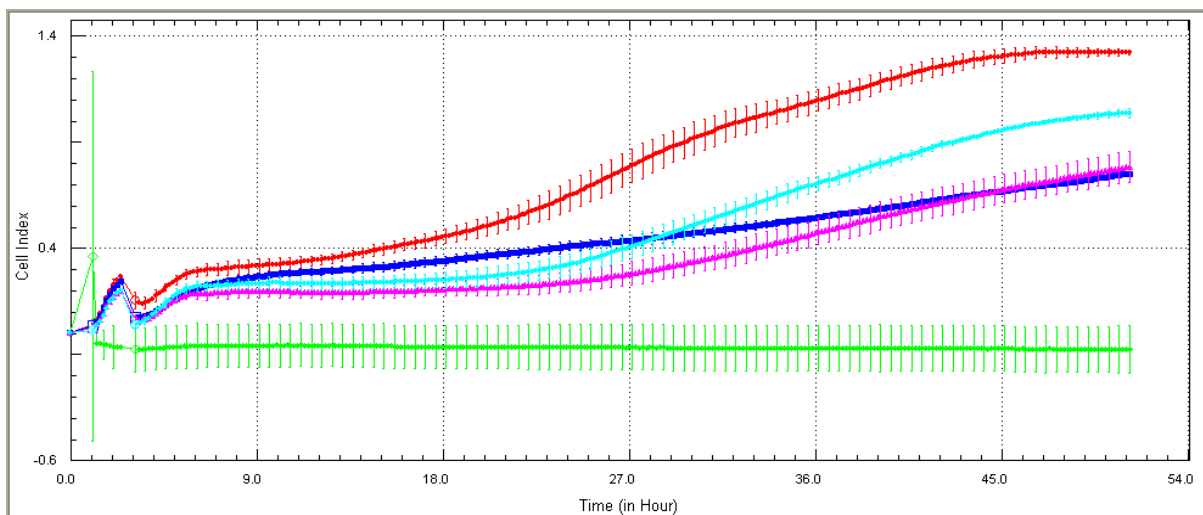


Figure 23: Anticancer activity of the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* (*n*-BuOH-PC) against the C6 cell line (2.5 x 10⁴ cells / well).

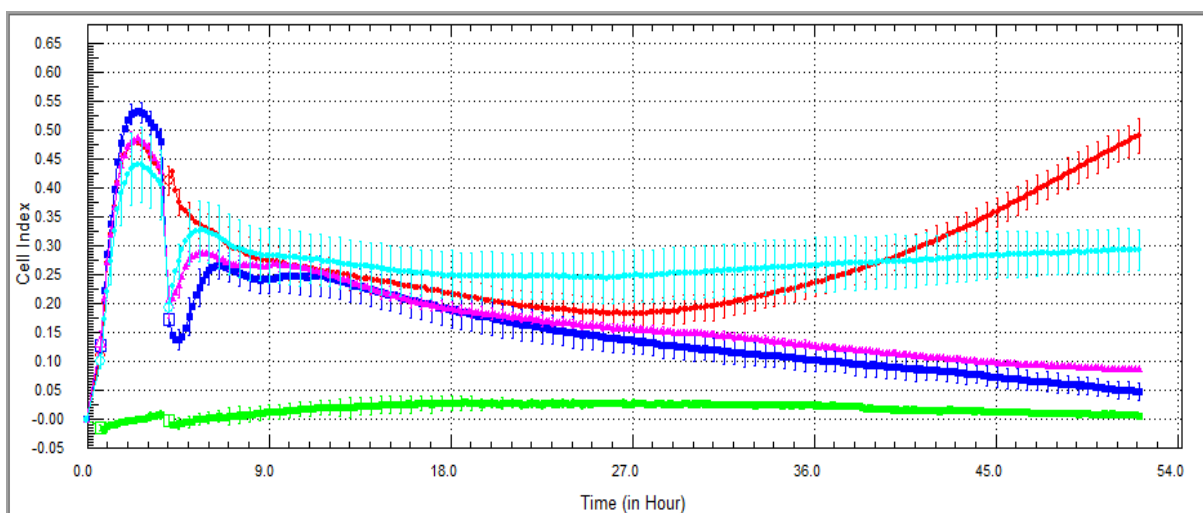


Figure 24: Anticancer activity of 5-fluorouracil as a positive control against the C6 cell line (2.5 x 10⁴ cells / well).

1.3.2 Cell proliferation

The antiproliferative activities of the plant acetate ethyl extract of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC) and the standard compound were determined in relation to the cell lines C6 and HeLa using the BrdU ELISA cell proliferation assay. 5-fluorouracil (5-FU) was used as a positive control. The antiproliferative activities of the samples and the positive control were studied in eight concentrations (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 and 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$). The IC₅₀ and IC₇₅ values of the extracts and 5-FU were identified using the ED50 plus v1.0 programs (Table 05).

The results obtained indicate that the lowest concentrations (5 and 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$) show a proliferative activity against HeLa cells but that it is significantly weak and that higher concentrations (50, 75 and 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$) exhibit more antiproliferative activity, high in comparison by 5-FU (Figure 25). The inhibition power at 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ was: 5-FU > EtOAc-PC.

However, it was observed that the EtOAc-PC extract had antiproliferative activity greater than that of 5-FU at 40-75 $\mu\text{g} / \text{mL}$ against C6 cells (Figure 26). The inhibition potency (at 75 $\mu\text{g} / \text{mL}$) was: EtOAc-PC > 5-FU extract.

Several concentrations of each extract were applied to the cells (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 and 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Each substance was tested twice in triplicate against cell lines. The data show an average of two individual experiments ($p < 0.01$).

The antiproliferative activity of the *n*-BuOH-PC extract is not tested by this test.

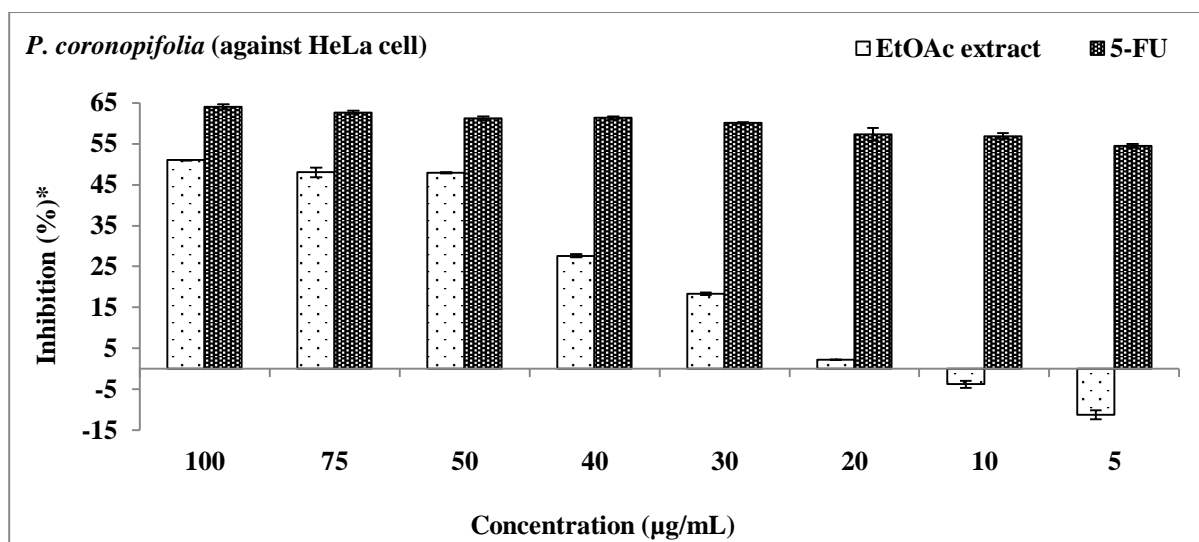


Figure 25: Antiproliferative activity of the ethyl acetate extract of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC) and 5-FU against the HeLa cell line (3×10^4 cells / well).

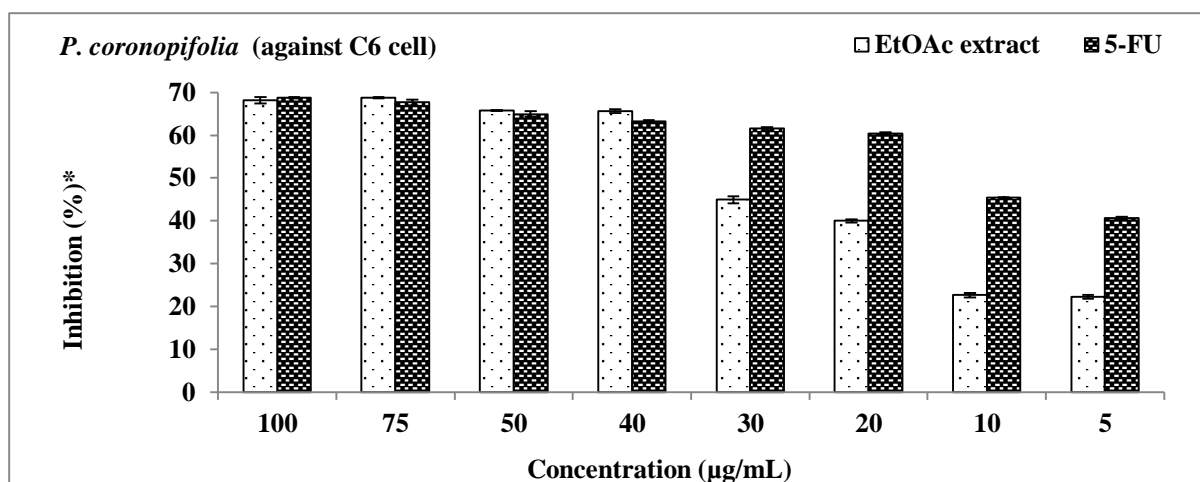


Figure 26: Antiproliferative activity of the ethyl acetate extract of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC) and 5-FU against the C6 cell line (3 x 10⁴ cells / well).

The antiproliferative activities by the EtOAc-PC and 5-FU extract are expressed in terms of IC₅₀ and IC₇₅ and are given in Table 05. Comparison of IC₅₀ values for HeLa and C6 cell lines indicates that these are the most active C6 lineages. Similarly, IC₇₅ values of EtOAc-PC extract show superior activity against C6 cell lines.

Table 05. IC₅₀ and IC₇₅ values of the ethyl acetate extract of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC) and 5-fluorouracil, presented by antiproliferative assay against HeLa and C6 cell lines (3 x 10³ cells / mL). * > 100 µg / mL. ** < 5 µg / mL.

simple		HeLa cells		C6 cells	
		IC ₅₀	IC ₇₅	IC ₅₀	IC ₇₅
<i>P. coronopifolia</i>	EtOAc	45.49	63.71	11.81	44.64
	5-FU	**	**	**	12.03

1.3.3 The cytotoxic effect

The cytotoxic effect of the extracts was determined by the lactate dehydrogenase (LDH) leak test against the C6 cell line and presented as percent cytotoxicity as shown in table 06. This test relies on the use of LDH cytotoxicity detection kit. The EtOAc-PC extract do not have cytotoxic effects comparatively with 5-Flu.

Table 06: Percent Cytotoxicity of ethyl acetate extracts *P. coronopifolia* (EtOAc-PC), and 5-FU Presented by Test Lactate dehydrogenase (LDH) leakage against the C6 cell line (5×10^3 cells / mL).

simple	Cytotoxicity (%)
EtOAc-PC	0
5-FU	19

2. Results of the *in vivo* experimental study

2.1 Evaluation of Malondialdehyde (MDA) in liver, kidney and heart homogenates

Results presented in figures 27, 28 and 29 shown a significant ($p < 0.01$) variation was detected in MDA level in rats treated with PCP plus plant extract (50 mg/kg). Extract administration normalized the value of MDA level compared to PCP group. The Vitamin E provided a significant protection ($p < 0.01$) against PCP induced lipid peroxidation.

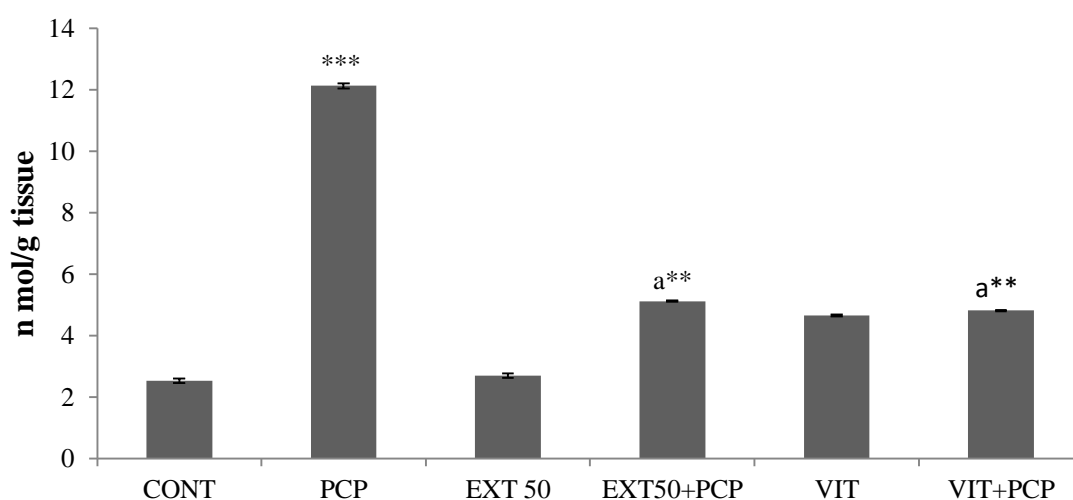


Figure 27: Effect of PCP, *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* and vitamin E on lipid peroxidation (MDA) in liver homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at the dose 50 mg/kg; VIT: vitamin E. Values are mean \pm standard deviation ($n = 6$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, compared to control group. a: compared to PCP group.

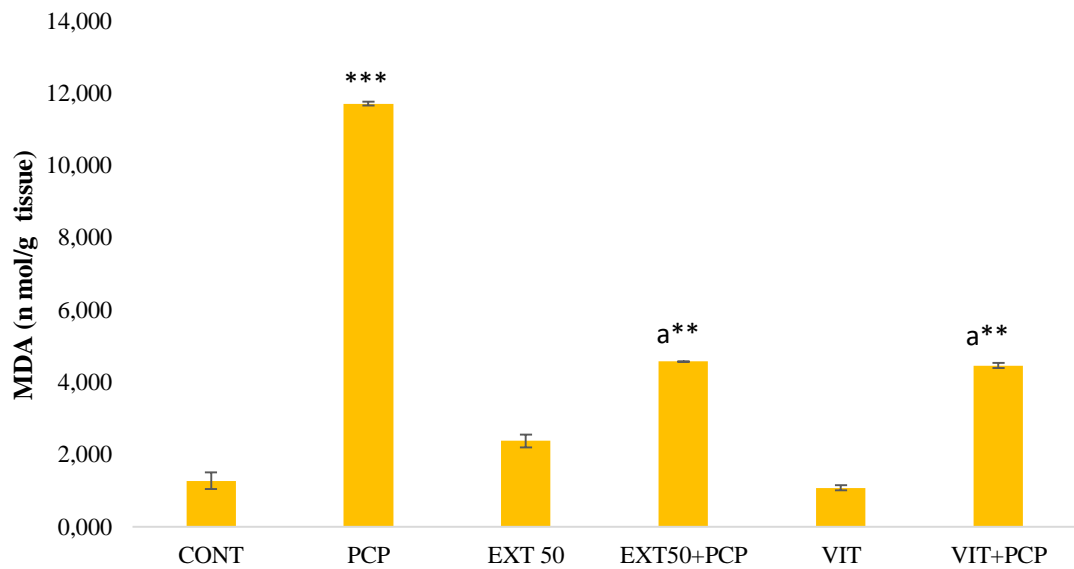


Figure 28: Effect of PCP, *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* and vitamin E on lipid peroxidation (MDA) in kidney homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at the dose 50 mg/kg; VIT: vitamin E. Values are mean \pm standard deviation (n = 6). **p <0.01; ***p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

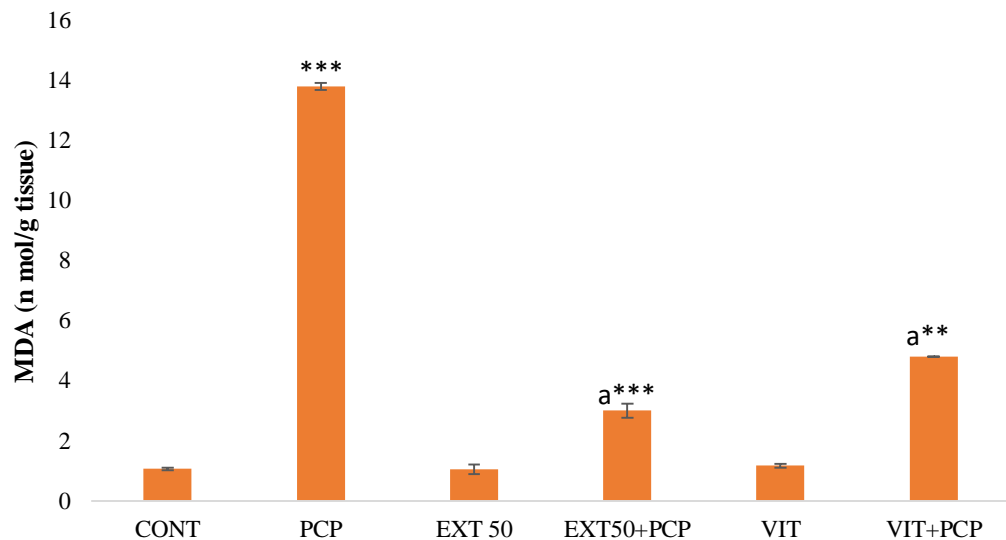


Figure 29: Effect of PCP, *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* and vitamin E on lipid peroxidation (MDA) in heart homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at the dose 50 mg/kg; VIT: vitamin E. Values are mean \pm standard deviation (n = 6). **p <0.01; ***p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

2.2 Evaluation of Glutathione content in liver, kidney and heart homogenates

A significant change in the Glutathione content system was caused by the PCP treatment compared to the control. In the co-treatment with plant extract and vitamin E, the concentration of reduced glutathione was considerably augmented in liver, kidney and heart compared to the control (figure 30, 31 and 33).

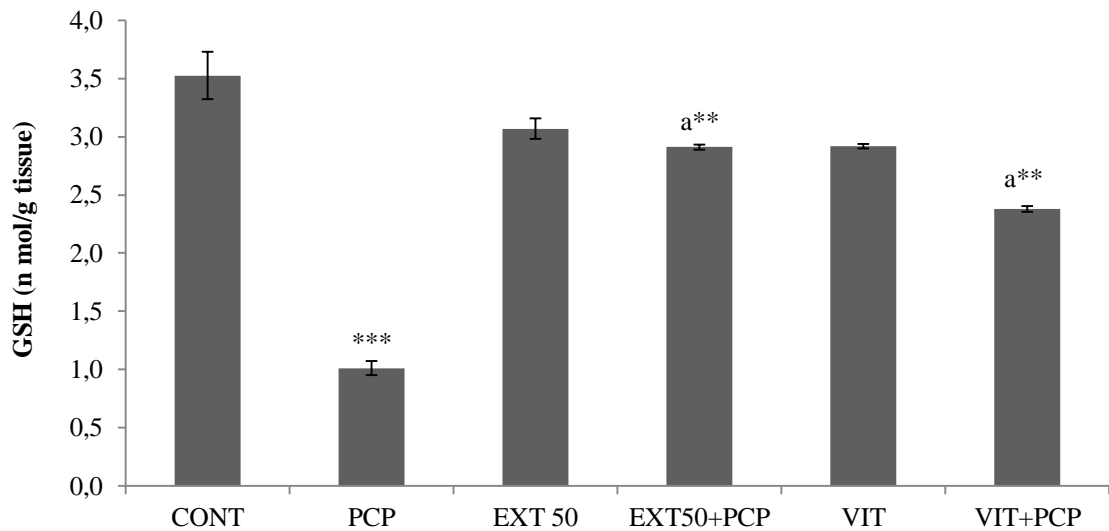


Figure 30: Effect of PCP, *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* and vitamin E on GSH levels in liver homogenate. Cont: control group; EXT 50: plant extract at the dose of 50 mg/kg; VIT: vitamin E. Values are mean \pm standard deviation (n = 6). ** p < 0.01; *** p < 0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

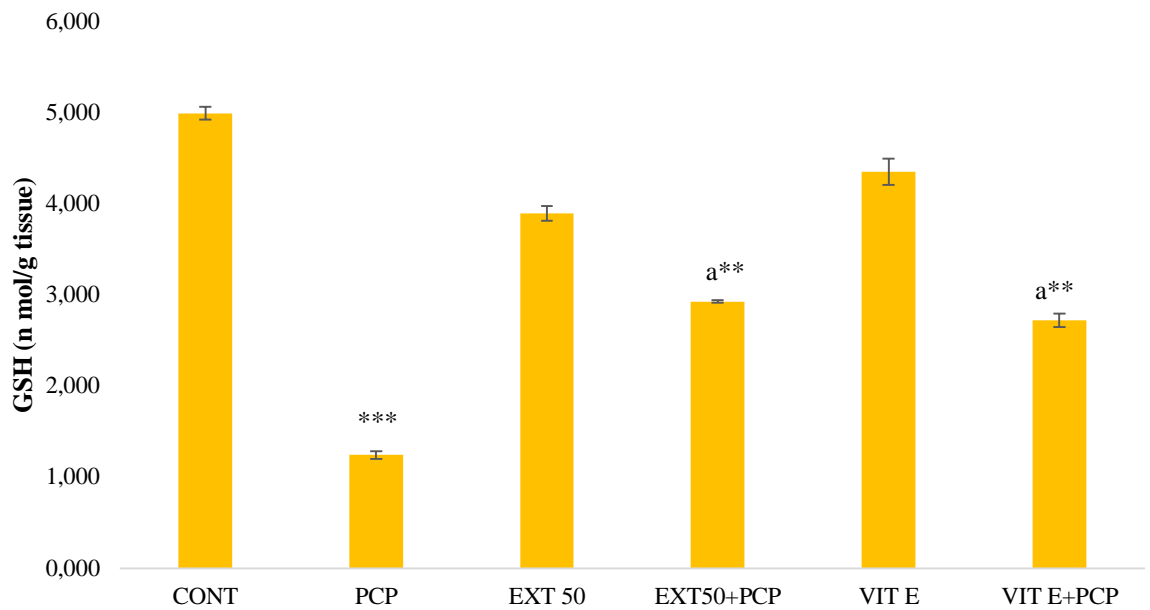


Figure 31: Effect of PCP, *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* and vitamin E on GSH levels in kidney homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at the dose 50 mg/kg; VIT: vitamin E. The values are mean \pm standard deviation (n = 6). **p <0.01; ***p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

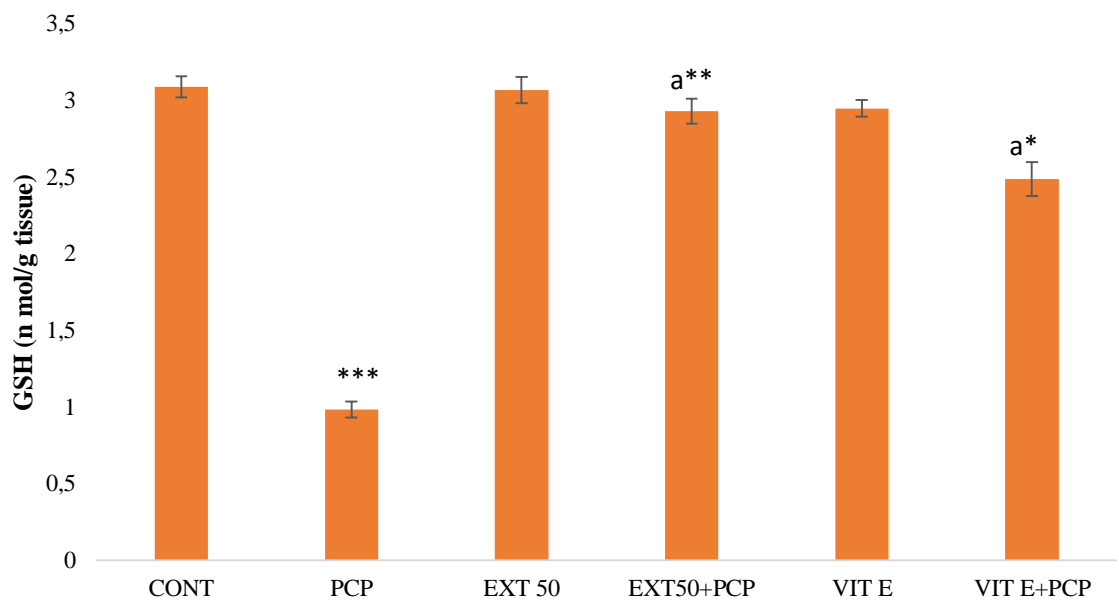


Figure 32: Effect of PCP, *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* and vitamin E on GSH levels in heart homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at the dose 50 mg/kg; VIT: vitamin E. The values are mean \pm standard deviation (n = 6). **p <0.01; ***p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

2.3 Evaluation of GPx activity in liver, kidney and heart homogenates

Oxidative worry encouraged by PCP initiated a significant ($P < 0.001$) alteration in antioxidant resistance system as GPx level, compared to the control group. The glutathione peroxidase activity was significantly decreased ($p < 0.01$) in the liver, kidney and heart of the PCP group. Co-treatment with plant extract and vitamin E led to an acceleration in the activity of enzyme. After consumption of PCP with extract and vitamin E, the GPx activity was nearer to results for these factors in the control group. Results were illustrated in figures 33, 34 and 35.

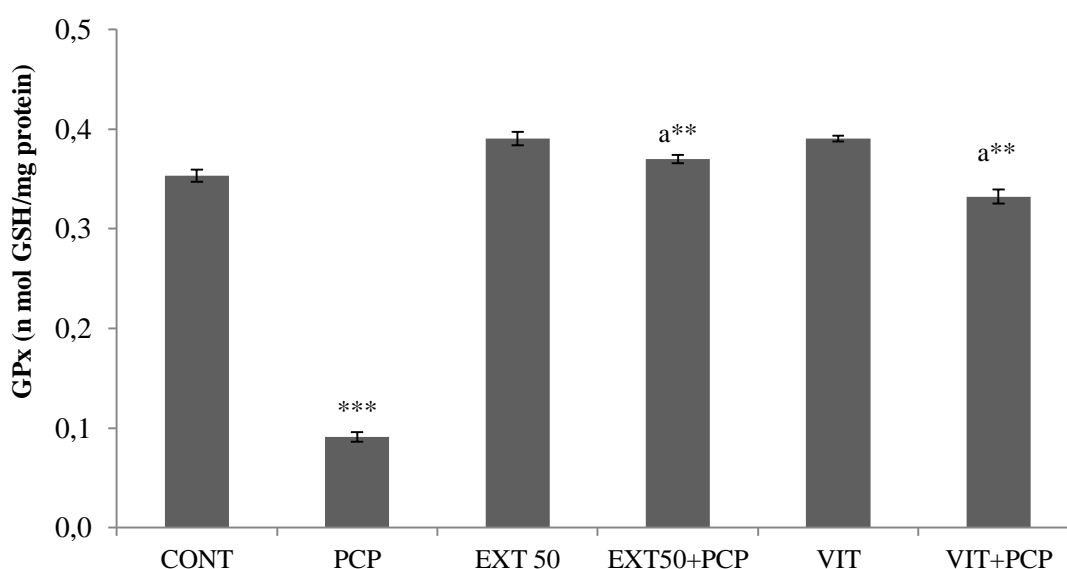


Figure 33: Effect of PCP, *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* and vitamin E on the antioxidant enzyme (GPx) in liver homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at the dose 50 mg/kg; VIT: vitamin E. The values are mean \pm standard deviation ($n = 6$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, compared to control group. a: compared to PCP group.

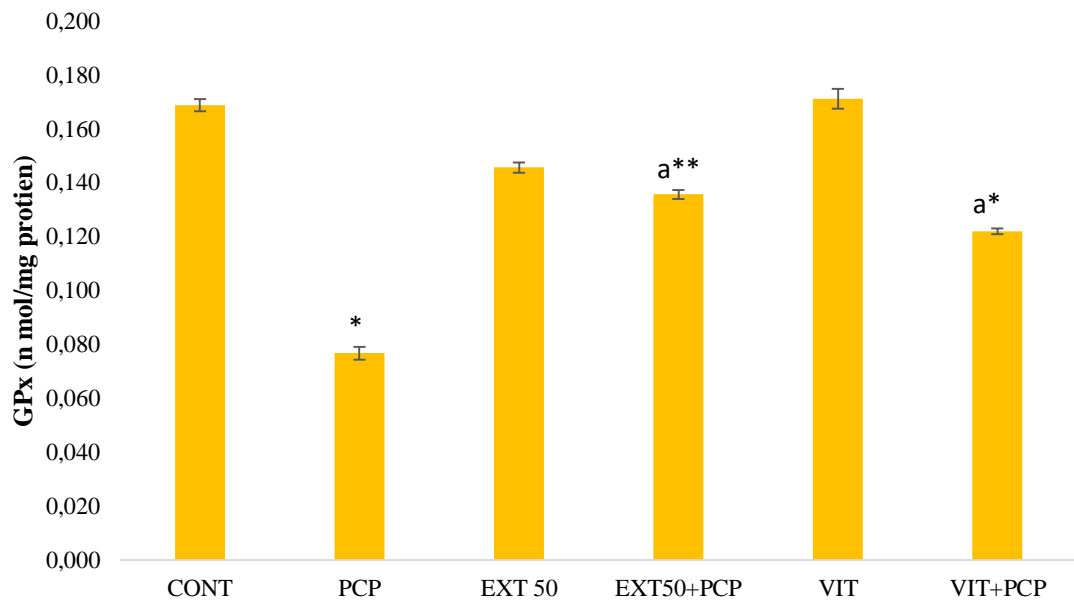


Figure 34: Effect of PCP, *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* and vitamin E on GPx levels in kidney homogenate. Cont: control group; EXT 50: plant extract at dose of 50 mg/kg; VIT: vitamin E. The values are mean \pm standard deviation (n = 6). ** p <0.01; *** p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

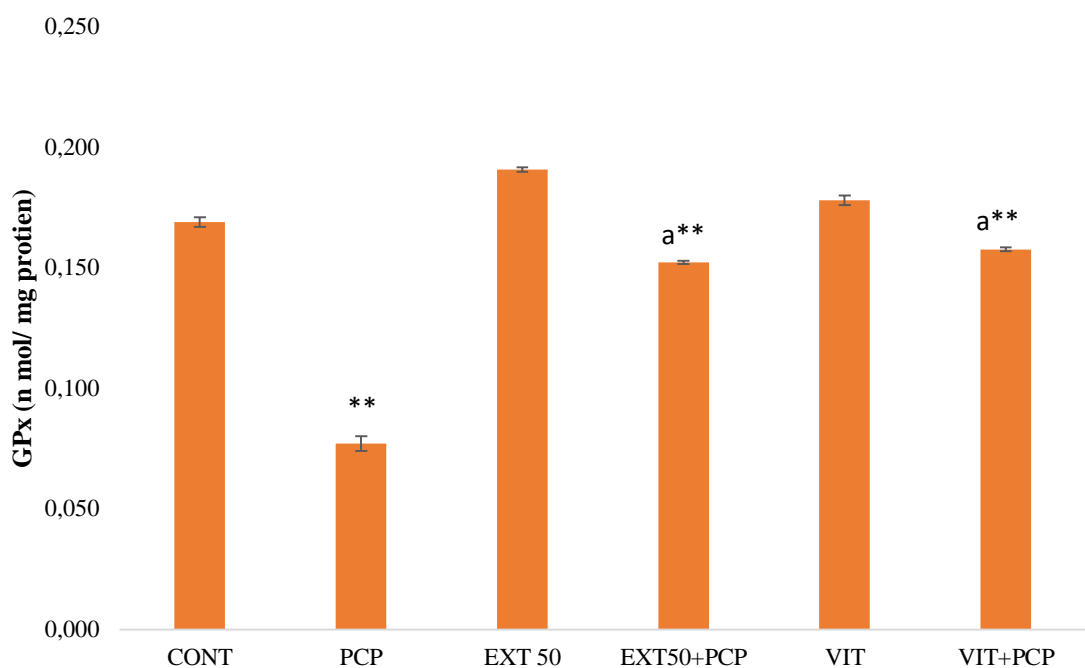


Figure 35: Effect of PCP, *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* and vitamin E on GPx levels in heart homogenate. Cont: control group; EXT 50: plant extract at the dose of 50 mg/kg; VIT: vitamin E. The values are mean \pm standard deviation (n = 6). ** p <0.01; *** p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

2.4 Results of Biochemical parameters

A significant increase in serum level of AST ($p < 0.01$) and ALT ($p < 0.05$) was detected in the PCP group; compared to the control group (table: 07). Pre-administration of plant extract or vitamin E significantly decreased AST and ALT activity ($p < 0.01$) compared with PCP alone. Maintenance of serum levels of serum transaminases was shown in the groups treated with plant extract and in vitamin E groups.

The results show a significant ($p < 0.01$) increase in serum cholesterol and triglyceride levels in the PCP group compared with the control group (Table 07). While in co-treatment with plant extract or vitamin E, cholesterol and triglyceride levels were significantly decreased in serum. Impairment of renal function was observed in PCP-treated animals that showed a significant ($p < 0.05$) increase in creatine serum level in the control group. Whereas the pretreatment with vitamin E or with the extract of the plant showed a significant decrease ($p < 0.05$) of the creatinine level by contribution to the group treated with PCP.

Table 07: Effect of PCP, *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* and vitamin E on biochemical levels in rats. AST : glutamate oxaloacetate transaminases, ALT : glutamate pyruvate transaminases, CHO : cholesterol, TRI : triglycerides, T-BIL : total bilirubins, CRE : creatines. Cont: control group; EXT 50: plant extract at the dose 50 mg / kg. Vit: vitamin E.

The values are mean \pm standard deviation ($n = 6$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, compared to control group. a: compared to PCP group.

	CONT	PCP	EXT 50	EXT50+PC P	VIT	VIT+PC P
ALT (U/L)	36,2 \pm 3,736	48,66 \pm 1,366 *	36,4 \pm 2,797	37,75 \pm 0,463 a*	37,5 \pm 5,043	37,8 \pm 1,814 a*
AST (U/L)	58 \pm 2,507	100,25 \pm 3,151 **	57,666 \pm 2,60	58,25 \pm 0,88 a**	57,5 \pm 3	58,5 \pm 2,31 a**
CHO (mg/dL)	36 \pm 1,88	54,66 \pm 2,75 **	36 \pm 0,756	37,5 \pm 0,886 a*	36,25 \pm 2,435	37,75 \pm 3,955 a*
TRI (mg/dL)	121,25 \pm 2,96	146,75 \pm 2,765 *	119 \pm 3,464	122,2 \pm 3,853 a*	120,4 \pm 3,921	121,2 \pm 2,044 a*
CRE (mg/L)	10,016 \pm 0,349	14,66 \pm 1,146 *	10,2 \pm 1,848	11,45 \pm 1,443 a*	8,9 \pm 1,066	9,875 \pm 0,509 a*
T-BIL (mg/L)	6,73 \pm 1,221	10,33 \pm 1,167 **	8,25 \pm 1,443	8,8 \pm 1,155 a*	5,1 \pm 0,393	6,4 \pm 2,811 a**

2.5 Evaluation of body weight of animals

Figure 36 shows the percentage of animal weight changes during the two weeks of treatment. The results show a normal increase in body weight in the animals treated with the extract and vitamin E in the control group.

Whereas in PCP treated rats, the percentage of changes in animal weight was stabilized (6%) from the 7th day of treatment. The difference is significantly strong ($p < 0.01$) between the percentage of changes in weight of the animals receiving the PCP by contribution to that of the untreated animals.

Body weight is gradually normalized during pre-treatment with the extract and with vitamin E with a significant ($p < 0.01$) increase compared to that of the PCP-fed rats.

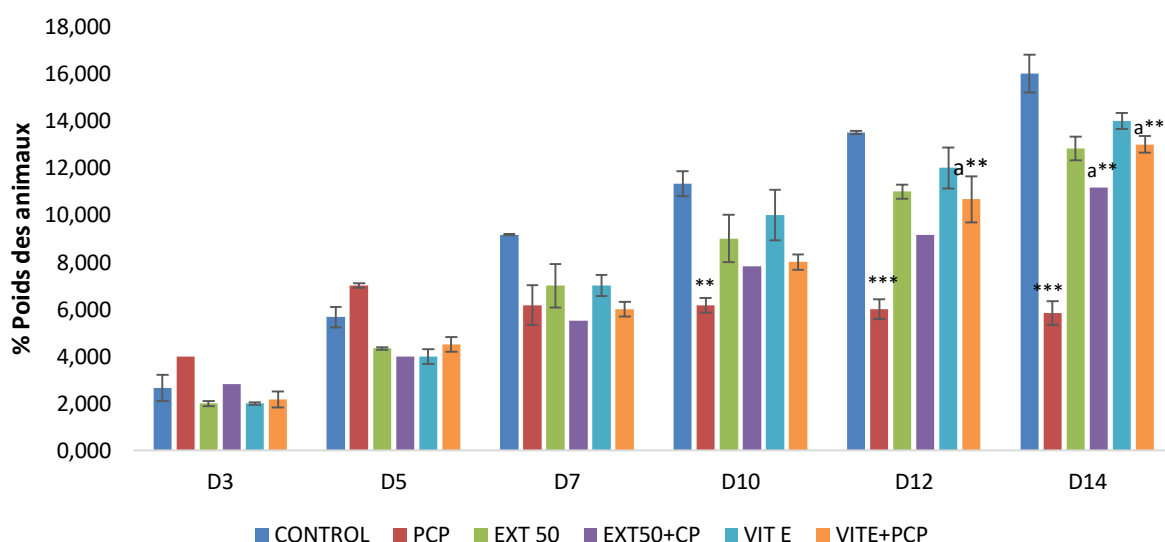


Figure 36: Effect of PCP, *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* and vitamin E on the weight of rats. Cont: control group; EXT 50: plant extract at the dose of 50 mg / kg; VIT: Vitamin E. The values are mean \pm standard deviation ($n = 6$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, compared to control group. a: compared to PCP group.

3. Conclusion

Phenolic compounds have beneficial effects attributed to their antioxidant properties. Realizing the fact that, this study was designed to evaluate in vitro the total content of phenolic

compounds and flavonoids, the antioxidant potency, oxidative protection of DNA and anticancer activity of ethyl acetate extract and *n*-butanol from *P. coronopifolia*, endemic plant. Experimental results showed that both extracts of this plant had an appropriate level of phenolics and flavonoids. In addition, they provided strong antioxidant and reducing power, high ROS scavenging power and lipid peroxidation inhibition. As they are inhibitors of oxidative damage to plasmid DNA, anticancer drugs at higher concentrations against certain cancer cells. The data obtained on these extracts of *P. coronopifolia* could be useful in human protection against infections and degenerative diseases.

Natural products from plants are still a necessary part of old-fashioned therapeutic systems in developing countries. Pentachlorophenol (PCP) is a well-known organochlorine compound primarily used as a general herbicide, pesticide and wood preservative, as well as a broad-spectrum insecticide and biocide.

In the present study, the *in vivo* antioxidant properties of the *n*-butanol extract of the plant *P. coronopifolia* have been studied in terms of its hepatoprotective effect against PCP-induced toxicity. Wistar Albino female rats were used in this study; PCP (20 mg / kg) and plant extract (50 mg / kg) were administered daily by gavage for two weeks.

The *in vivo* experimental study showed that the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* showed a significant increase in liver weights and LPO levels in the liver of animals treated with this pesticide while they were decreased in the liver. Control group and that treated by the plant extract. In addition, PCP caused significant decreases in the activities of the GPx antioxidant enzyme and GSH levels, and this decrease was reduced in the groups treated with the plant extract. In addition, PCP-induced hepatotoxicity increased serum enzyme activity; while these enzymes have been restored in animals treated with the plant extract.

The significant decrease in GSH levels and GPx enzyme activity and the increase in serum levels of enzymes and LPOs revealed the antioxidant properties of this extract. The plant extract has a high antioxidant potential, and completely prevented the toxic effect of PCP on the above liver and serum parameters. Pre-treatment with this extract and vitamin E decreased functional alterations and structural liver damage.

In conclusion, extracts of the plant *P. coronopifolia* are powerful antioxidants contains a very important content of bioactive substance, act as antiproliferatives against certain cancer cell lines, a potent protector of plasmid DNA and a liver protector on the structural and functional plan.

2 - Experimental study of the plant: *Gaillonia reboudiana* Coss.

I. Material and methods

I-1- Chemicals

The chemicals utilized in the tests were in analytical grade and purchased from Sigma–Aldrich and Roche.

I-2- Plant material *Gaillonia reboudiana* Coss.

➤ Classification

Table 08: Systematic classification of the plant *G. reboudiana* Coss.

Reign	Plantae
Branch	Spermatophytes
Under Branching	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Order	Rubiales
Family	Rubiaceae
Kind	<i>Gaillonia</i>
Species	<i>Reboudiana</i>
Reign	Plantae

- Traditional name: السدرة البيضاء , Sedra elbeyda, Djilfna, Fessyet es-sib, Sedret es-sib, Tibskit n-tmgart.
- Distribution: Endemic species present in northern Sahara and Western Sahara.
- Description: Low shrub, the bark of the trunk and older branches is gray, the twigs are often opposed. The opposite leaves are fleshy, elongated and narrow, wider at their tips and terminated by a point. The flowers are located at the end of twigs, they have a tubular corolla with four lobes hidden by many bracts hairy that gives a feathery appearance to all. The blooming flowers are white, in bud they are tinged with brown or purple as well as the bracts. The size is 20 to 40 cm.

- Harvest: The plant material was harvested in May 2011, 70 km from the city Bechar on the road to Beni Abbes, southwest Algeria. It was authenticated by *Mr. Mohamed Benabdelhakem*, director of the nature preservation agency, Bechar. One specimen (GR0511-BEC-ALG-53) was deposited at the herbarium level of the VARENBIOMOL research unit, University of Frères Mentouri Constantine 1.
- Extraction: It is performed by *Dr Boussaha Sara* at the laboratory of Research Unit and Valuation of Natural Resources, Bioactive Molecules, Physicochemical and Biological Analyzes (VARENBIOMOL), Frères Mentouri Constantine 1 University, Constantine, Algeria.

The air dried plant material protected from sunlight and moisture, with a total weight of 980 g (150 g leaves, 190 g flowers and 640 g stems) of the species *G. reboudiana* Coss. and hard. is sprayed. The three types of organs are macerated separately in the petroleum ether once for 24 hours. The mixtures are then filtered and concentrated to dryness, thus giving 4.3 g of petroleum ether extract (flowers: 2 g, leaves: 0.5 g and stems: 1.8 g). The grounds are then extracted with chloroform 3 times for 48 hours. After filtration and evaporation of the solvent, 26.47 g of chloroform extract were obtained (flowers: 10.93 g, leaves: 6.91 g and stems 8.63 g). Recovered marcs are again macerated in methanol three times for 48 hours. After filtration and total evaporation of the solvent, 42.16 g of total methanol extract (flowers: 22.99 g, 9.4 g leaves, 9.77 g stems) are obtained.

3 Animals

Adult Wistar Albino female rats (n = 48, age = 7 to 8 weeks) weighing 213 ± 18 g were used in this study. The rats were obtained from the Department of Biology, Mentouri University, Constantine, Algeria (in April, 2012). They were housed in cages, kept in an air-conditioned room between 22 and 26 ° C and fed standard rat granules with free access to food and water at will. The rats were acclimatized to the laboratory environment for two weeks before the start of the study. The European Community Directive (86/609 / EEC) and the national rules on animal care have been followed.

4 *In vitro* experimental study

This study was performed using the metanol extract of *G. reboudiana* (MeOH-GR). The Antioxidant properties, DNA Damage inhibition efficiency and cell culture were performed as

descript in the first study: Experimental study of the plant: *Perralderia coronopifolia* Coss. (Page 32– 37)

5 *In vivo* experimental studies

This study was performed using the metanol extract of *G. reboudiana* (MeOH-GR), PCP was used as xenobiotic which induced toxicity. Vitamin E was used as positive control.

➤ Treatment of animals

PCP (20 mg / kg body weight) and / or plant extract (100 mg / kg body weight) was administered daily by gavage for two weeks. Vitamin E is used as a positive control with a dose of 100 mg / kg of body weight per gavage. Rats are randomly divided into 8 groups:

- ✓ Group I (n = 6) was served as a negative control.
- ✓ Group II (n = 6) received 20 mg PCP / kg for two weeks.
- ✓ Group III (n = 6) received the plant extract at 100 mg / kg. (EXT100) for two weeks.
- ✓ Group IV (n = 6) received plant extract at 100 mg / kg and PCP at 20 mg / kg (EXT100 + PCP) for two weeks.
- ✓ Group V (n = 6) received the plant extract at 50 mg / kg. (EXT50) for two weeks.
- ✓ Group VI (n = 6) received plant extract at 50 mg / kg and PCP at 20 mg / kg (EXT50 + PCP) for two weeks.
- ✓ Group VII (n = 6) received vitamin E (VITE) at 100 mg / kg, this group was designated as a positive control group for two weeks.
- ✓ Group VIII (n = 6) received vitamin E at 100 mg / kg and PCP at 20 mg / kg. (VIT + PCP) for two weeks.

The measurement of body mass variation was followed during the experiment. The animals were weighed every morning during the two weeks of treatment. The recorded results allowed to progressively evaluate the variation of the body weight of rats.

Preparation of homogenate tissue, evaluation of Malondialdehyde (MDA) content, Glutathione content (GSH), GPx activity and the histological studies as well as the statistical analysis were performed as described in the first study: Experimental study of the plant: *Perralderia*

coronopifolia Coss. (Page 37 – 40) at the Animal Department, Faculty of Nature and Sciences, Frères Mentouri Constantine 1 University, Constantine, Algeria.

While the analysis of biochemical parameters (AST, ALT, cholesterol, triglyceride total bilirubin and creatin) were analysed using kits obtained at the laboratory of biological analyses at the University-Military Hospital Centre of Ali Mendjli, Constantine, Algeria.

II. Results and discussion

2. Results of the *in vitro* experimental study

2.1 Antioxidant activity

2.1.1 The content of total phenolic compounds and flavonoids

The polyphenol assay results in the methanolic extract of the *G. reboudiana* (MeOH-GR) plant reveal that this extract contains a high quantity of phenolic compounds, presented in μg of gallic acid equivalent (GAE) per mg of vegetable material. The MeOH-GR extract contains $363.67 \pm 5.96 \mu\text{g GAE} / \text{mg extract}$, (Figure 39).

On the other hand, the quantitative evaluation of flavonoids has shown that the MeOH-GR extract contains a large quantity of flavonoids, presented in μg equivalents of quercetin (QE) per mg of plant material ($249 \pm 2.68 \mu\text{g EQ} / \text{mg of extract}$) (Figure 40).

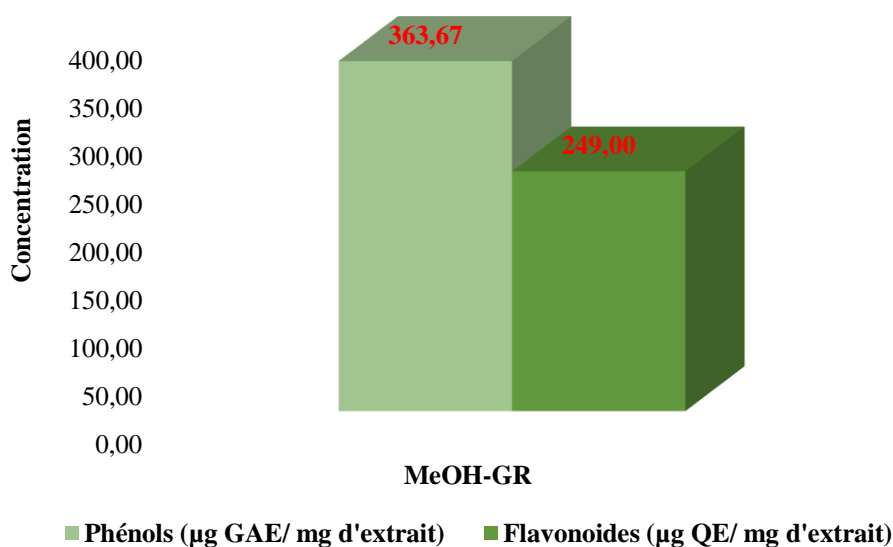


Figure 40: Total content of methanolic extract of *G. reboudiana* (MeOH-GR) plant in phenols and flavonoids. The values are mean \pm standard deviation ($n = 3$).

2.1.2 Total antioxidant activity

Table (07) shows the result obtained concerning the total antioxidant activity of the MeOH-GR extract. This extract showed total antioxidant activity but lower than antioxidant standards.

2.1.3 Reducing power

The MeOH-GR extract has a very low reducing power ($p < 0.001$) in comparison with the antioxidant standards: trolox, BHA and vitamin C (Table 07).

2.1.4 H₂O₂ scavenging activity

The results shown in Table (07) showed that the MeOH-GR extract has an activity of trapping H₂O₂ closer to that of trolox.

2.1.5 Metal chelating activity

The MeOH-GR extract plant has a higher chelating activity of metals than that of vitamin E at a dose of 200 µg / mL and 500 µg / mL. In addition, it is greater than that of vitamin C at the concentration of 100 µg / mL and 200 µg / mL (Table 07).

Table 07: Total antioxidant activity, reducing power, free radical scavenging, hydrogen peroxide scavenging and metal chelating activity of methanolic extract of *G. reboudiana* (MeOH-GR) using antioxidant standards as positive controls: EDTA, trolox, BHA, vitamin C and vitamin E. BHA: butylated hydroxyanisole. EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic acid. Vitamin C (2.7) and BHA (1.5). Values are means ± standard deviation. (n = 6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to antioxidant standards.

Simple	Antioxidante activity			
	3 g mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹	500 µg mL ⁻¹
Total antioxidant activity, 695 nm				
MeOH-GR	0.07±0.01	0.1±0.07**	0.46±0.02	0.95±0.02**
Vitamin C	0.042±0.020	0.294±0.013	0.999±0.065	2.699±0.019
BHA	0.074±0.009	0.193±0.021	0.683±0.024	1.511±0.056
Reducing power, 700 nm				
MeOH-GR	0.07±0.01***	0.12**	0.28**	0.49±0.01***
Vitamin C	0.545±0.005	1.129±0.030	3.496±0.211	3.817±0.049
BHA	0.336±0.014	0.587±0.015	1.158±0.129	3.496±0.047

Trolox	0.192±0.009	0.373±0.010	0.914±0.048	1.880±0.096
H₂O₂ scavenging activity, %				
MeOH-GR	26.98±3.87	34.92±2.46	47.62±4.26	49.21±2.46
Vitamin C	17.46±0.75	34.09±2.08	53.96±0.94	66.66±0.57
Vitamin E	30.15±0.94	38.09±0.96	47.61±3.64	55.56±0.82
BHA	25.39±3.23	41.26±3.85	50.79±4.07	60.31±3.82
Trolox	31.70±2.05	41.25±0.77	46.03±2.67	50.79±0.62
Metal chelating activity, %				
MeOH-GR	4.24±0.51	19.97±0.19*	29.96±0.88	35.58±0.66**
EDTA	10.24±1.34	21.85±0.67	37.45±3.04	45.94±1.21
Vitamin C	6.49±2.71	10.61±0.51	23.22±1.16	40.57±0.77
Vitamin E	6.24±1.27	8.86±1.84	20.22±2.07	23.60±3.16
BHA	2.12±0.39	21.10±0.70	36.83±3.67	52.56±1.84

2.1.6 DPPH[•] scavenging activity

Measurement of DPPH[•] trapping capacity was carried out in MeOH-GR extract and in vitamin C (ascorbic acid) as a radical scavenger (antioxidant standard). The result obtained by this test makes it possible to draw the graph of the variation of the percentage inhibition as a function of the concentration for the different extracts.

This method shows that this extract is an antioxidant with a dose-dependent decrease of the DPPH[•] radical. That is, the percent reduction increases with the increase in the concentration of the extracts to a threshold where the percent inhibition is stabilized with the increase in concentration. The MeOH-GR extract has:

- ✓ A higher percentage inhibition of the DPPH radical (91%) observed with a dose of 150 µg / mL of the extract.
- ✓ 50% of the DPPH radicals were trapped with a 40 µg / mL dose of the extract.
- ✓ Significant dose-dependent inhibition of the DPPH radical was also observed.

The concentration of extract and standard causing 50% inhibition of DPPH[•] (IC₅₀) is calculated graphically from the extract regression line (Figure 41). The MeOH-GR reacted positively to the anti-radical test with DPPH[•]. It showed an IC₅₀ value of 43.1 ± 1.77 µg / mL.

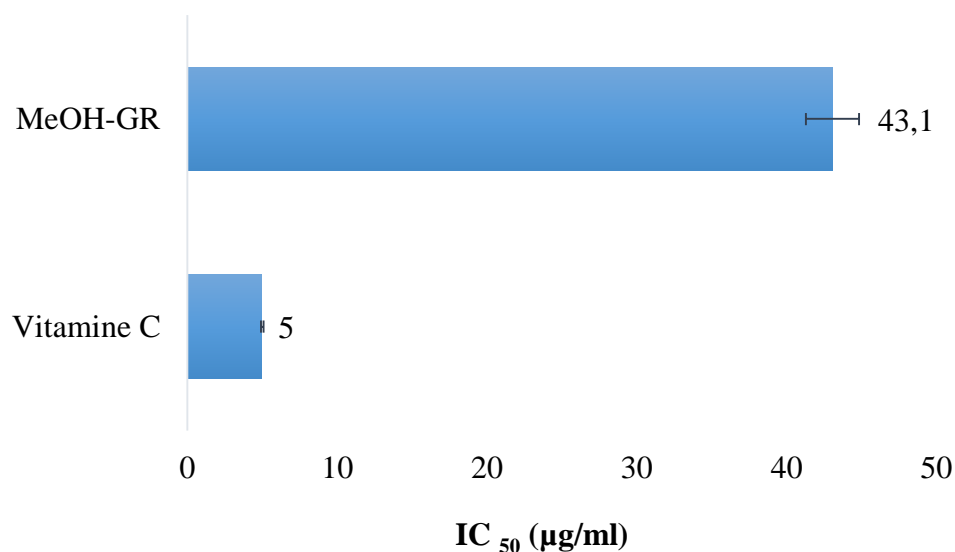


Figure 41: IC₅₀ values of metanol extract of *G. reboudiana* (MeOH-GR) plant and vitamin C against DPPH radical scavenging. The values are mean ± standard deviation (n = 3).

2.1.7 Hydroxyl radical (OH[•]) scavenging activity

The capacity of the MeOH-GR extract to trap the hydroxyl radical (OH[•]) is also evaluated. At a dose of 100 µg / mL, it has an anti-radical content of 60.18%. Whereas Vitamin C shows a 98% inhibition with a dose of 50 µg / mL under the same conditions (Figure 42).

This explains the neutralization of the hydroxyl radicals formed by the Fenton reaction in the reactive medium. The median inhibitory concentration of 11.17 ± 0.01 and 38.09 ± 1.18 µg / mL of sample for vitamin C and MeOH-GR, respectively. This anti-radical activity is less potent than that obtained with vitamin C under the same conditions (Figure 43). A dose-dependent inhibition of the hydroxyl radical (OH[•]) was also determined.

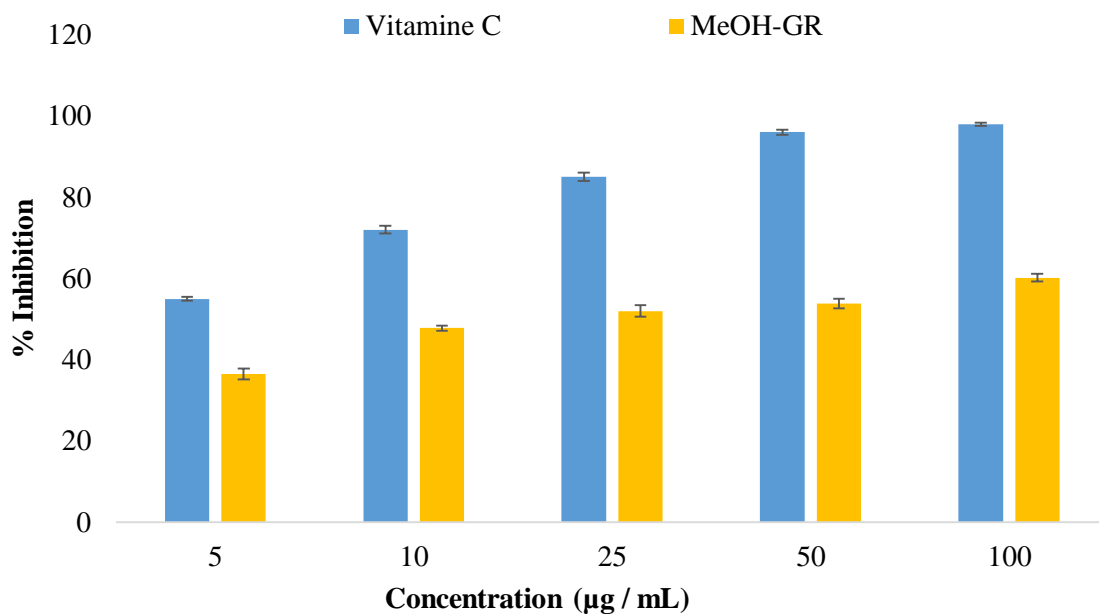


Figure 42: Anti-radical activity of metanolic extract of *G. reboudiana* plant (MeOH-GR) and vitamin C (antioxidant standard) against hydroxyl radical (OH[·]).

The values are mean ± standard deviation (n = 3).

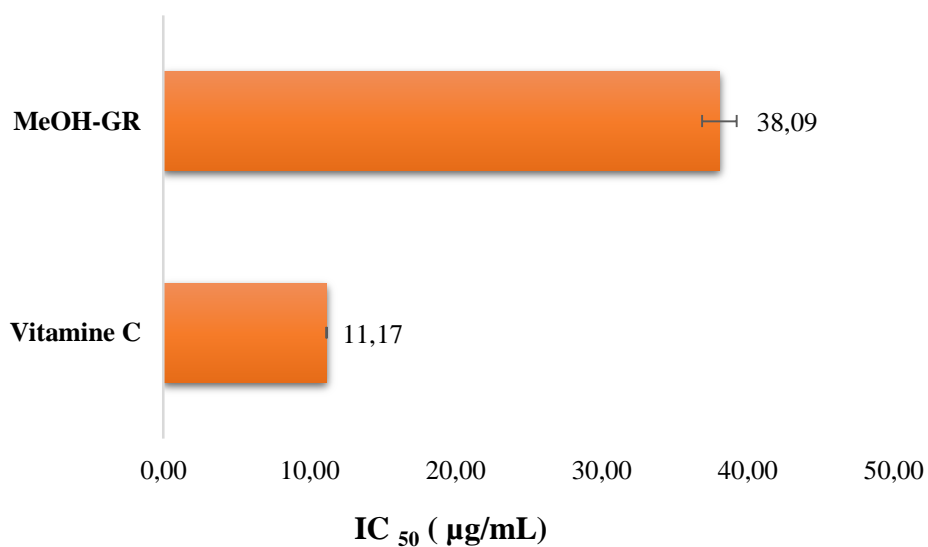


Figure 43: IC₅₀ values of metanolic extract of *G. reboudiana* plant (MeOH-GR) and vitamin C against hydroxyl radical scavenging (OH[·]). Values are mean ± standard deviation (n = 3).

2.1.8 The inhibitory power of lipid peroxidation

The inhibition capacity of the lipid peroxidation (non-enzymatic) of MeOH-GR is tested in the egg yolk homogenate by FeSO₄ is evaluated by contribution to vitamin C (an antioxidant standard). The result obtained is shown in Figure (44).

This result shows that our extract has a significantly weak ability to inhibit lipid peroxidation compared to the positive control. Under the same conditions and at a dose of 200 µg / mL, this inhibition capacity and: 97.90% and 66.41% for vitamin C and MeOH-GR, respectively.

These results also make it possible to derive the median inhibitory concentration (IC₅₀) of the extract and put it in comparison with that of vitamin C. The IC₅₀ are unveiled and shown in Figure (45).

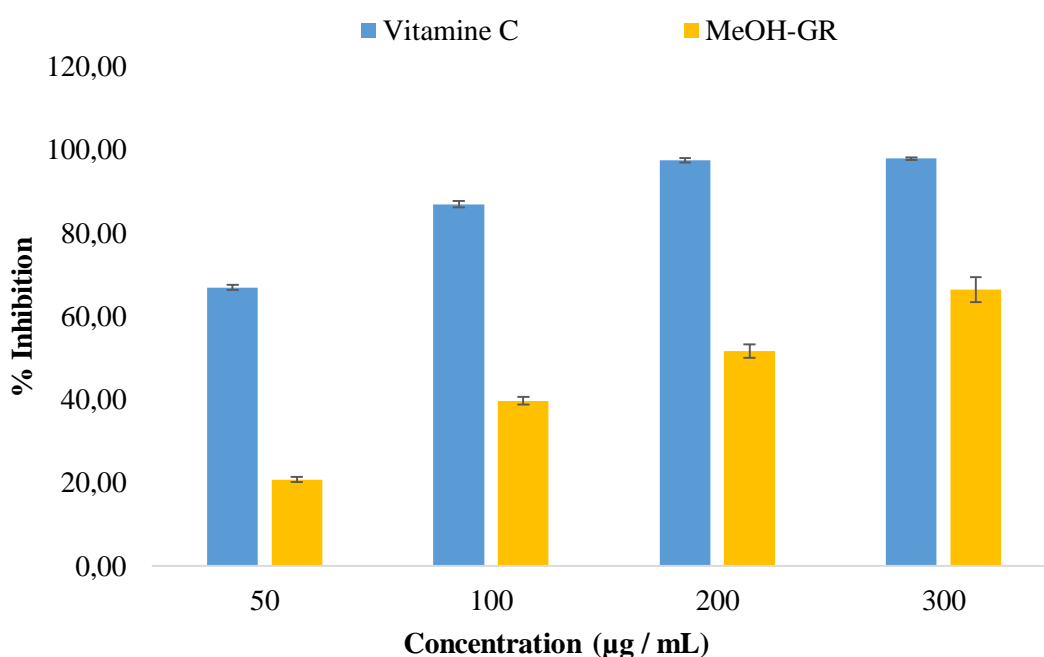


Figure 44: Inhibitory activity of lipid peroxidation (MDA formation) of metanolic extract of *G. reboudiana* plant (MeOH-GR) and vitamin C (antioxidant standard).

The values are mean ± standard deviation (n = 3).

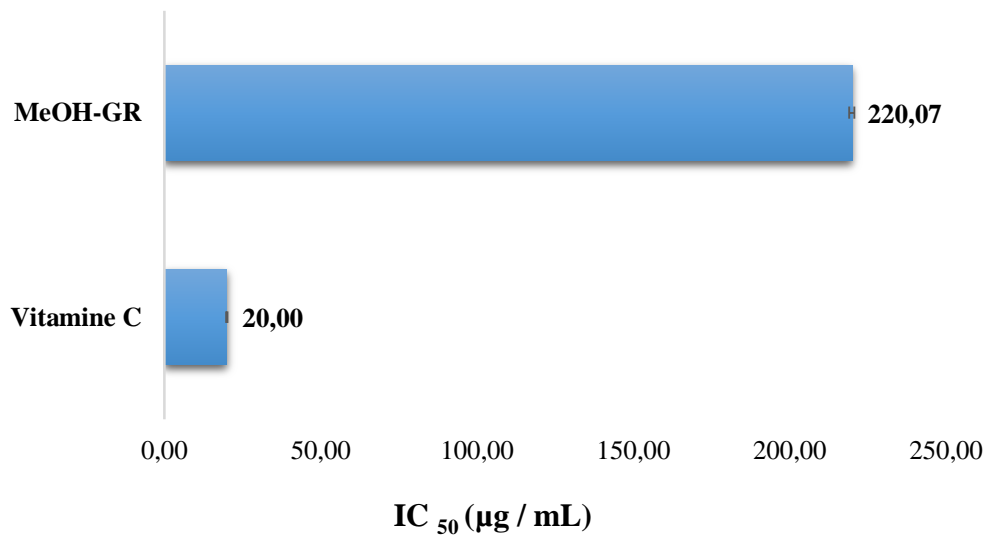


Figure 45: IC₅₀ values of methanolic extract of *G. reboudiana* (MeOH-GR) plant and vitamin C vis-à-vis the inhibition of lipid peroxidation. The values are mean ± standard deviation (n = 3).

2.2 Efficacy of inhibition of DNA damage

The results of this test showed that at a dose of 50 µg, MeOH-GR does not protect most of the amount of plasmid DNA in the sample against oxidative damage. Two bands are obtained in agarose gel electrophoresis, one dense in the same level of the band obtained with non-irradiated control (C₀) (super-coiled circular DNA) and the other light in the same level of the band obtained with untreated irradiated control (C_R) (damaged plasmid DNA) (Figure 46).

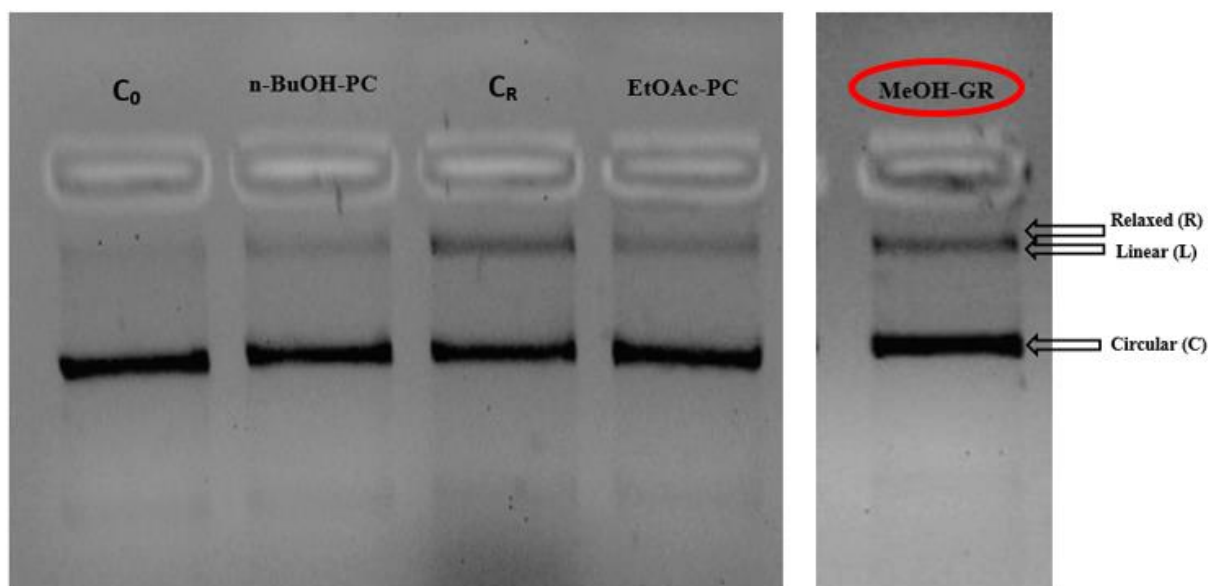


Figure 46: Effect of metanolic extract of *G. reboudiana* plant (MeOH-GR) (50 μg) against oxidative damage in plasmid DNA 46966 caused by UV photolysis of H_2O_2 (3%, v / v). C_0 = untreated DNA. MeOH-GR = UV irradiated DNA treated with MeOH-GR extract, C_R = DNA not irradiated with UV.

2.3 Anticancer properties

2.3.1 Determination of the anticancer activity using the xCELLigence instrument

The results of the anti-cancer test against HeLa cancer cells are shown in figures 47 and 48 with deflection bars of the metanolic extract of *G. reboudiana* plant (MeOH-GR) and 5-fluorouracil (5-FU)., respectively. Figures 49 and 50 show the results of the anticancer test against C6 cancer cells, with deflection bars of: MeOH-GR and 5-FU, respectively.

During the first two hours, untreated cells with extracts were observed in normal growth, but in a nutrient medium had no increase. Then, the extract was added to the cell culture medium of each well of E-plate 96. But, it did not have activity against the cancer cell lines tested against 5-FU.

Each substance was triplicate tested twice against cell lines using the xCELLigence RTCA instrument. As can be seen in the diagram, several concentrations of extract were applied to the cells and each color represents a different concentration (—250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, —100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, —50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, —Control, —Medium).

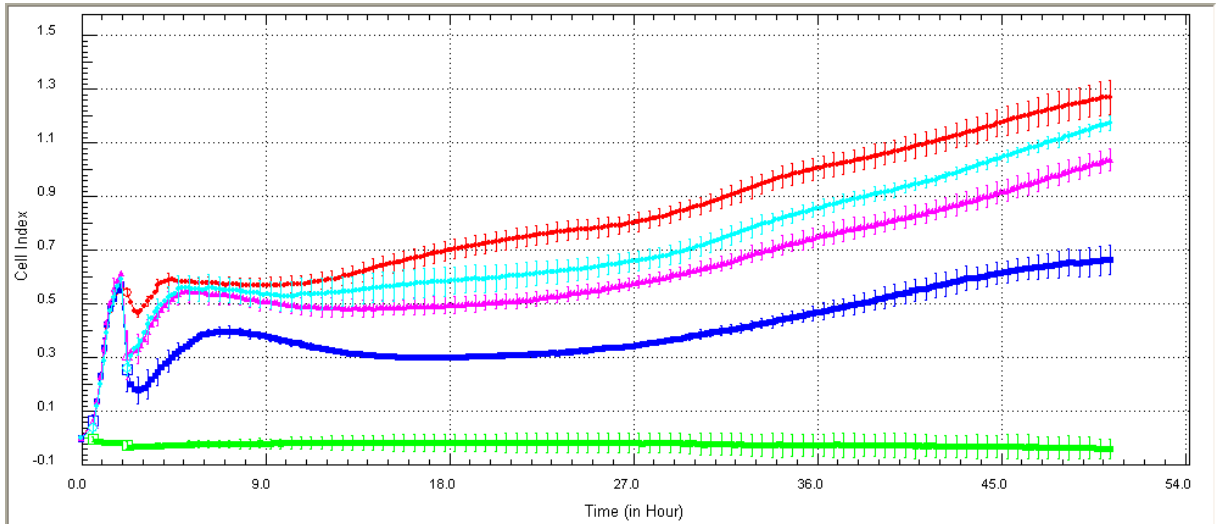


Figure 47: Anticancer activity of methanolic *G. reboudiana* extract (MeOH-GR) against the HeLa cell line (2.5×10^4 cells / well).

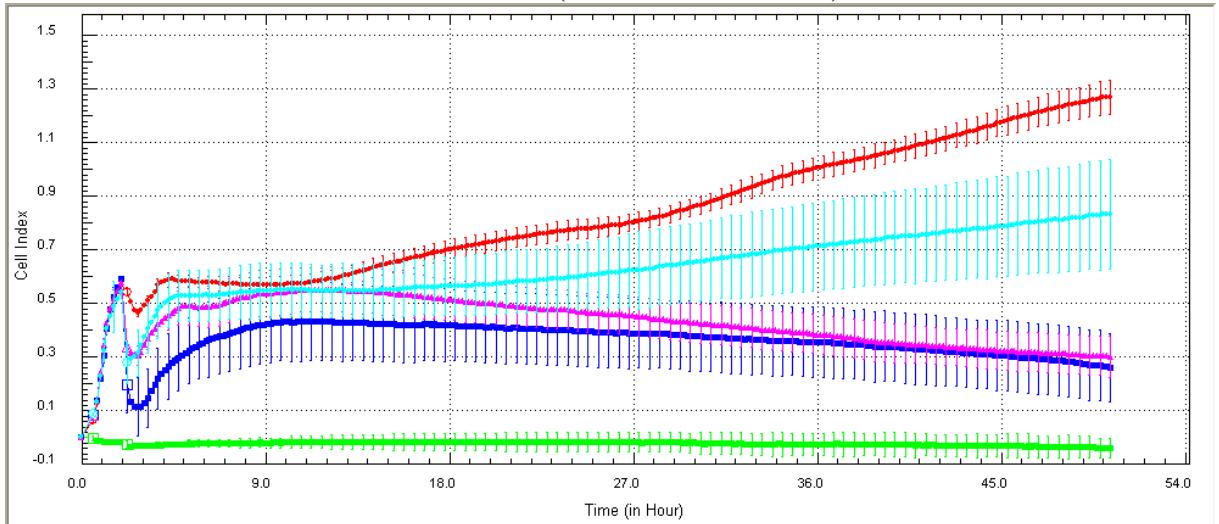


Figure 48: Anticancer activity of 5-florourasil as a positive control against the HeLa cell line (2.5×10^4 cells / well).

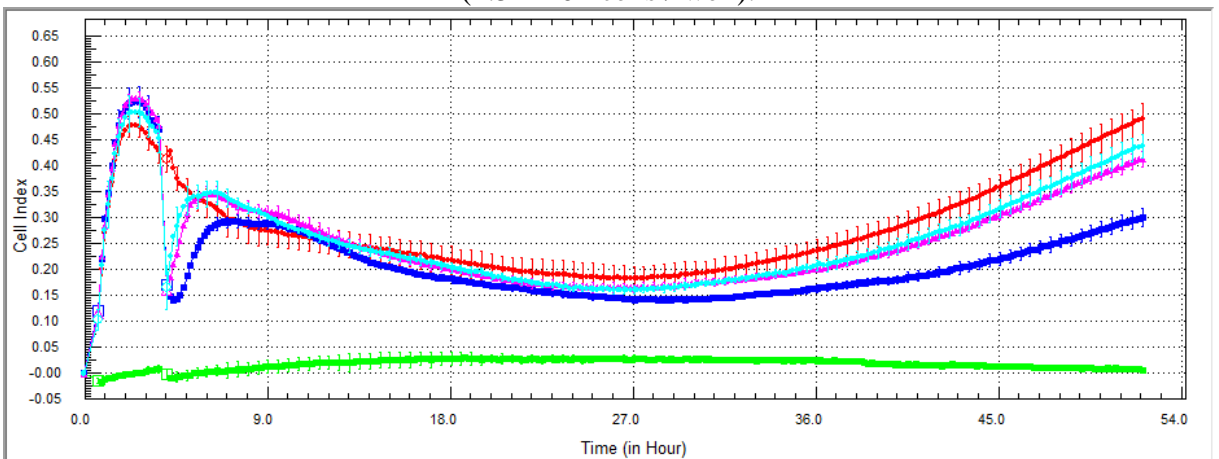


Figure 49: Anticancer activity of methanolic *G. reboudiana* extract (MeOH-GR) against the C6 cell line (2.5×10^4 cells / well).

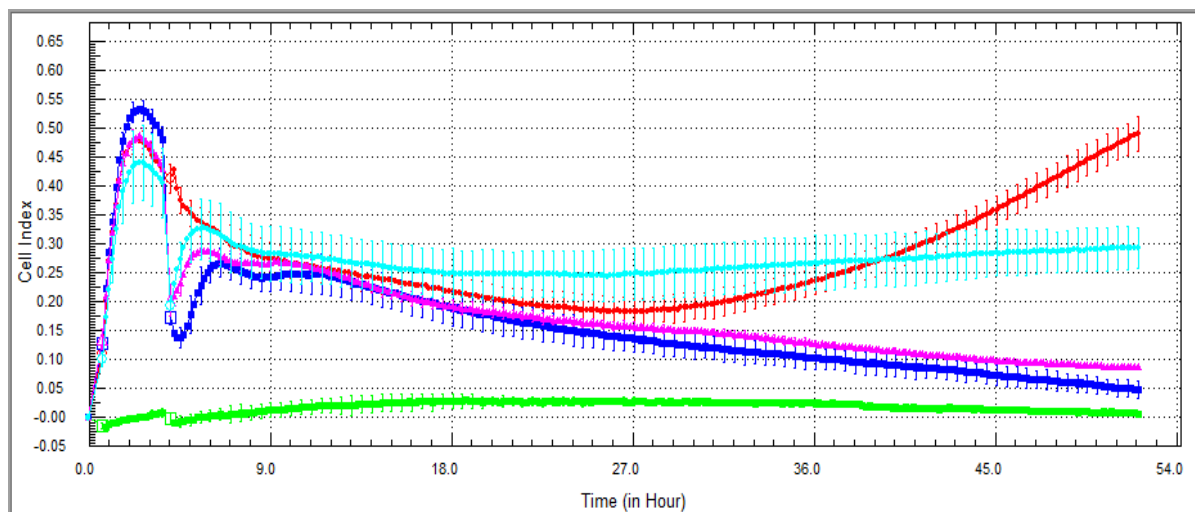


Figure 50: Anticancer activity of 5-florourasil as a positive control against the C6 cell line (2.5 x 10⁴ cells / well).

2.3.2 Cell proliferation

The antiproliferative activities of MeOH-GR extract and standard were determined relative to the C6 and HeLa cell lines using the BrdU ELISA cell proliferation assay. 5-fluorouracil (5-FU) was used as a positive control. The antiproliferative activities of samples and positive control were studied in eight concentrations (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 and 100 µg / mL). The IC₅₀ and IC₇₅ values of the extracts and 5-FU were identified using the ED50 plus v1.0 programs (Table 08).

The results obtained indicate that MeOH-GR extract has no activity against HeLa cells as compared to 5-FU (Figure 51). But against C6 cells, it was detected as having a very significantly weak activity compared to 5-FU (Figure 52). The inhibition potency (at 75 µg / mL) was: 5-FU > MeOH-GR extract.

Each substance was tested twice in triplicate against cell lines. The data show an average of two individual experiments (p <0.01).

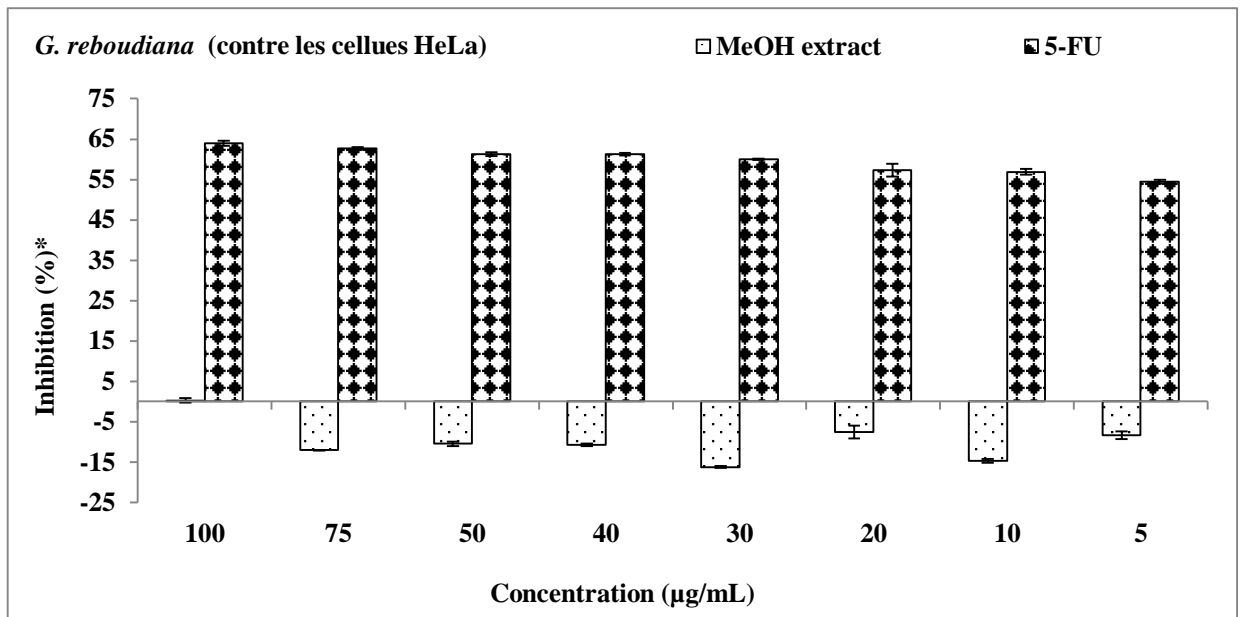


Figure 51: Antiproliferative activity of the metanolic extract of *G. reboudiana* (MeOH-GR) and 5-FU against the HeLa cell line (3×10^4 cells / well).

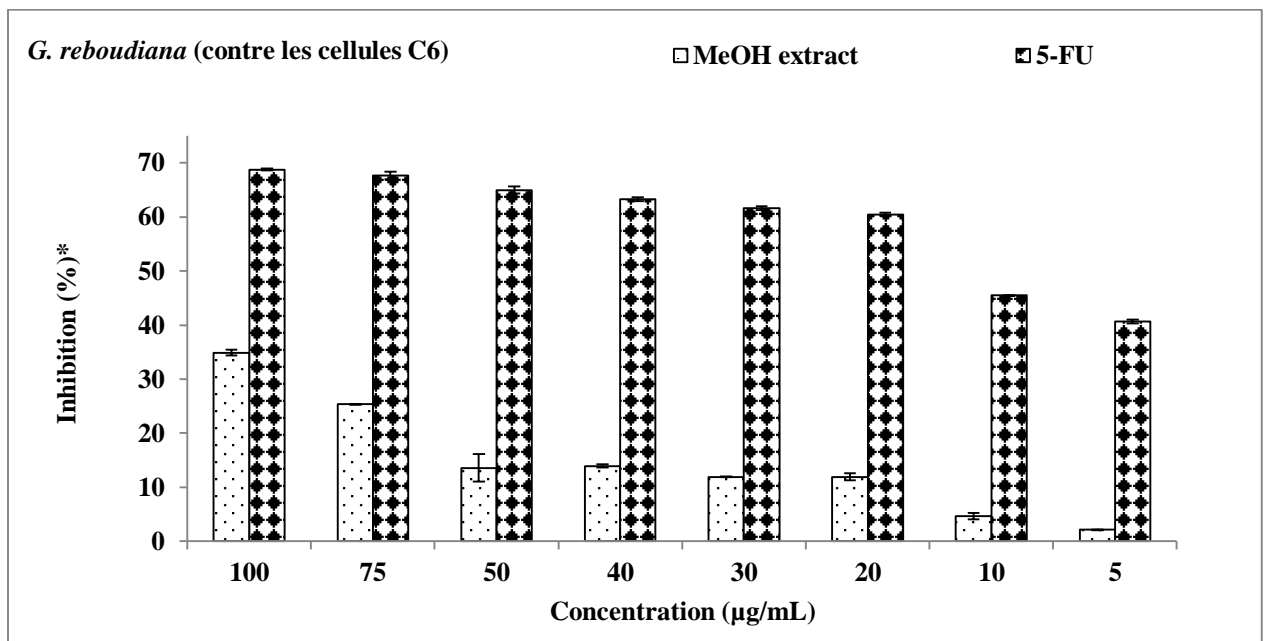


Figure 52: Antiproliferative activity of the metanolic extract of *G. reboudiana* (MeOH-GR) and 5-FU against the C6 cell line (3×10^4 cells / well).

The antiproliferative activities by the MeOH-GR and 5-FU extract are expressed in terms of IC_{50} and IC_{75} and are given in Table (08). Comparison of IC_{50} values for HeLa and C6 cell lines indicates that C6 lines are the most active.

Table 08: IC₅₀ and IC₇₅ values of the metanolic extract of *G. reboudiana* (MeOH-GR) and 5-fluorouracil, presented by antiproliferative assay against the HeLa and C6 cell lines (3 × 10³ cells / mL). *>100 µg/mL. **<5 µg/mL.

simple		HeLa cells		C6 cells	
		IC50	IC75	IC50	IC75
<i>G. reboudiana</i>	MeOH	*	*	49.56	77.00
5-FU		**	**	**	12.03

2.3.3 The cytotoxic effect

The cytotoxic effect of the extracts was determined by the lactate dehydrogenase (LDH) leak test against the C6 cell line and presented as percent cytotoxicity as shown in Table (09). This test relies on the use of kit for detecting LDH cytotoxicity. The MeOH-GR extract does not have cytotoxic effects compared to 5-Flu.

Table 09: Percent Cytotoxicity of methanolic extract of *G. reboudiana* Plant (MeOH-GR) and 5-FU Presented by Lactate Dehydrogenase (LDH) Leak Test against C6 Cell Line (5 x 10³ cells / mL).

simple	Cytotoxicity (%)
MeOH-GR	0
5-FU	19

4. Results of the *in vivo* experimental study

4.1 Evaluation of Malondialdehyde (MDA) in liver, kidney and heart homogenates

In rats receiving PCP and in comparison with the control group, the results obtained in Figures (53, 54 and 55) show a highly significant (p <0.001) increase in the level of MDA in the homogenates of the livers, kidneys and hearts, respectively. However, a highly significant (p <0.001) normalization of this was observed during pre-treatment with the plant extract (50 and

100 mg / kg) and vitamin E. This result indicates that the extract with two doses and vitamin E provided significant protection ($p < 0.001$) against PCP-induced lipid peroxidation.

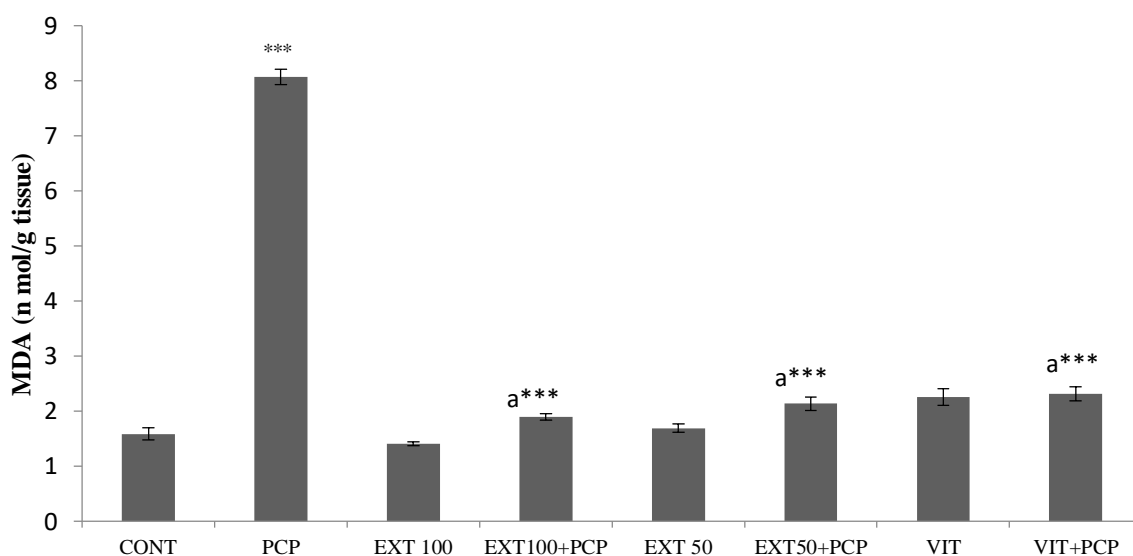


Figure 53: Effect of PCP, methanolic extract of *G. reboudiana* Plant and vitamin E on lipid peroxidation (TBARs content) in liver homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at 50 mg/kg; EXT 100: plant extract at 100 mg / kg, VIT: vitamin E at 100 mg / kg. The values are mean \pm standard deviation ($n = 6$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, compared to control group. a: compared to PCP group.

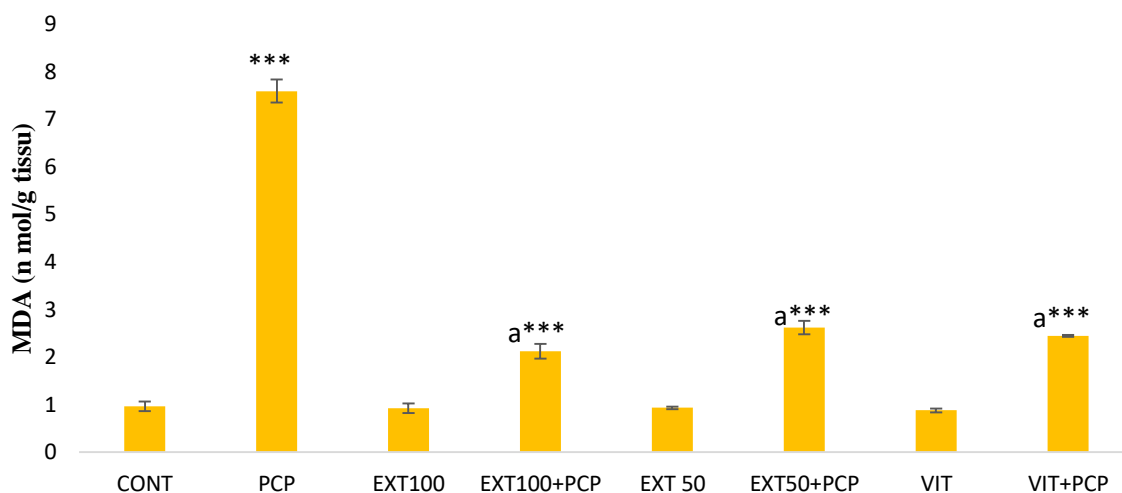


Figure 54: Effect of PCP, methanolic extract of *G. reboudiana* Plant and vitamin E on lipid peroxidation (TBARs content) in kidney homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at 50 mg/kg; EXT 100: plant extract at 100 mg / kg, VIT: vitamin E at 100 mg / kg. Values are mean \pm standard deviation ($n = 6$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, compared to control group. a: compared to PCP group.

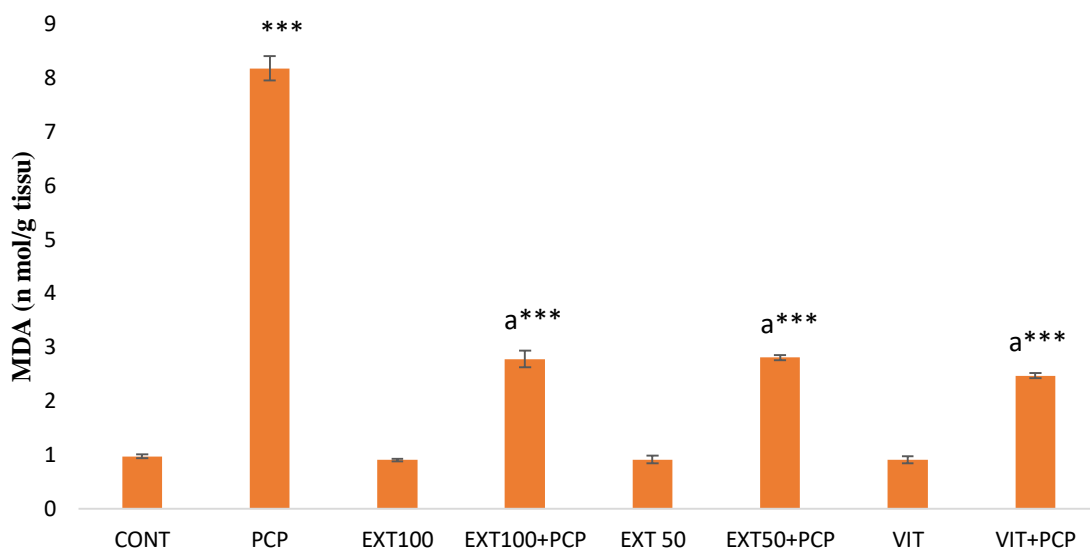


Figure 55: Effect of PCP, methanolic extract of *G. reboudiana* Plant and vitamin E on lipid peroxidation (TBARs content) in heart homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at 50 mg/kg; EXT 100: plant extract at 100 mg / kg, VIT: vitamin E at 100 mg / kg. The values are mean \pm standard deviation (n = 6). ** p <0.01; *** p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

4.2 Evaluation of Glutathione content in liver, kidney and heart homogenates

The results shown in Figures (56, 57 and 58) show a highly significant (p <0.001) decrease in GSH level in the liver, kidney and heart of the PCP fed rats to the untreated control group.

As well, the results show a remarkable pretreatment effect with the methanolic extract at either the 50 or 100 mg / kg dose, on the reduced glutathione level. A very significant increase (p <0.001) in the level of GSH in the homogenates of the rats treated with the two doses of this extract by contribution to the group treated with PCP.

The different homogenates of the groups treated with the methanolic extract at a dose of 50 or 100 mg / kg as well as with vitamin E have a level of GSH closer to that of the untreated group.

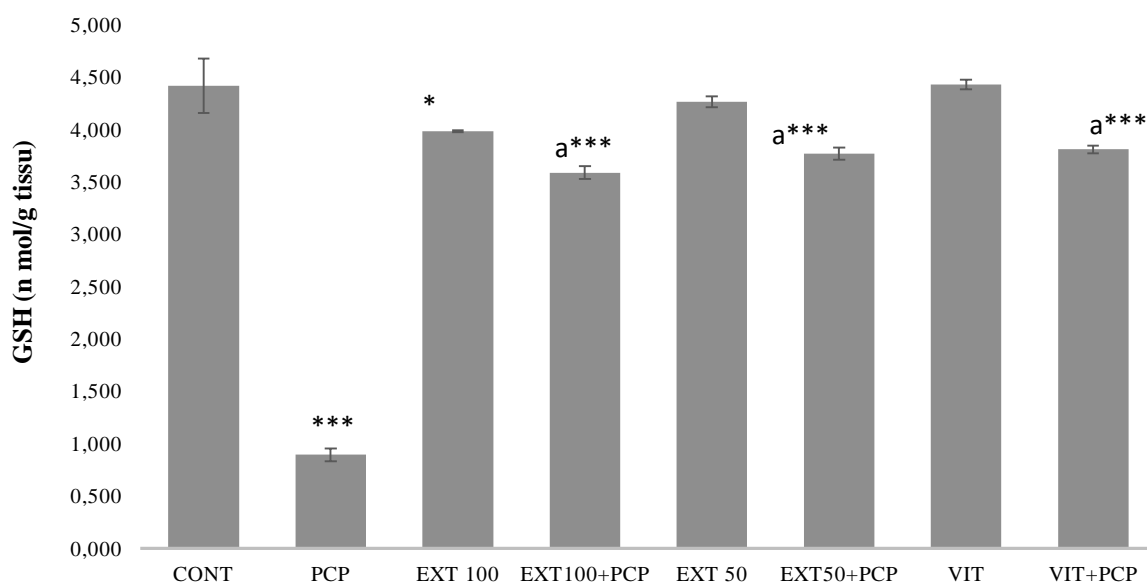


Figure 56: Effect of PCP, methanolic extract of *G. reboudiana* and vitamin E on GSH levels in liver homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at 50 mg/kg; EXT 100: plant extract at 100 mg / kg, VIT: vitamin E at 100 mg / kg. Values are mean \pm standard deviation (n = 6). ** p <0.01; *** p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

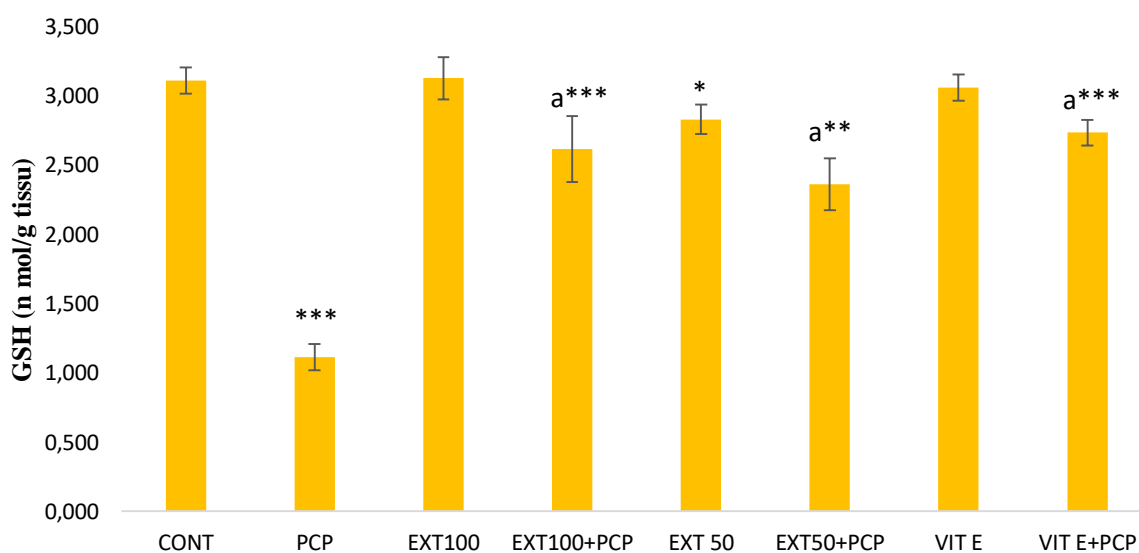


Figure 57: Effect of PCP, methanolic extract of *G. reboudiana* and vitamin E on GSH levels in kidney homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at 50 mg/kg; EXT 100: plant extract at 100 mg / kg, VIT: vitamin E at 100 mg / kg. Values are mean \pm standard deviation (n = 6). ** p <0.01; *** p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

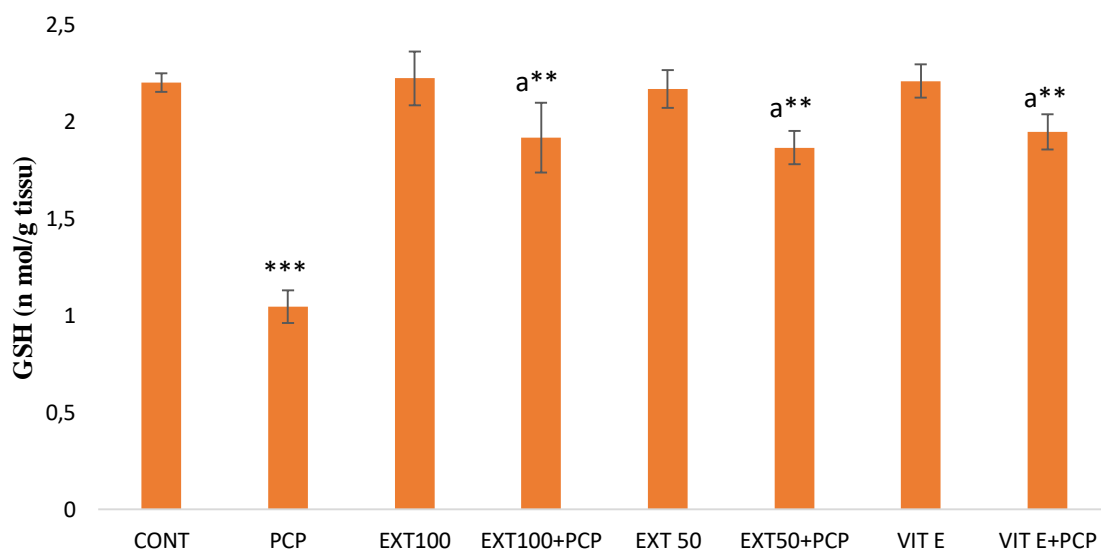


Figure 58: Effect of PCP, methanolic extract of *G. reboudiana* and vitamin E on GSH levels in heart homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at 50 mg/kg; EXT 100: plant extract at 100 mg / kg, VIT: vitamin E at 100 mg / kg. Values are mean \pm standard deviation (n = 6). ** p <0.01; *** p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

4.3 Evaluation of GPx activity in liver, kidney and heart homogenates

PCP-induced oxidative damage significantly reduced (P <0.001) GPx glutathione peroxidase activity compared to the control group by causing significant (P <0.001) alteration of the hepatic system of antioxidant resistance as well as renal and cardiac system. Moreover, this activity is accelerated following the pre-administration of plant extract and vitamin E.

In addition, in rats receiving vitamin E or the plant extract at either 50 or 100 mg / kg, this enzyme activity was closer to that of the control group (Figure: 59, 60 and 61) which indicates that the enzymatic activity of the antioxidant system of liver, kidney and heart is maintained at its normal level.

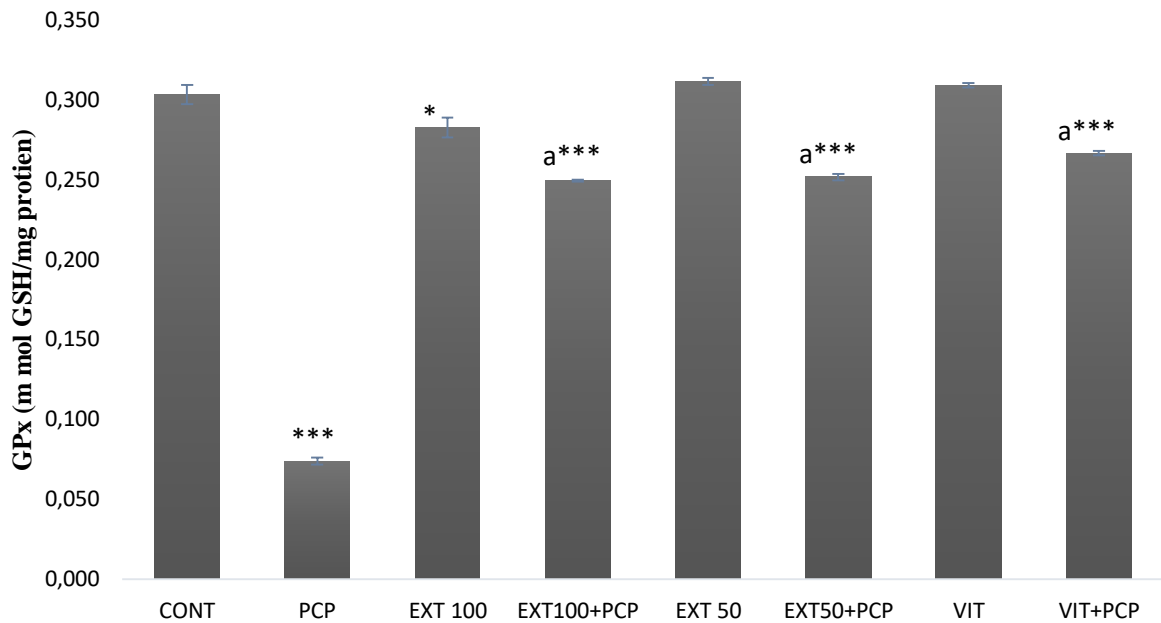


Figure 59: Effect of PCP, methanolic extract of *G. reboudiana* and vitamin E on GPx activity in liver homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at 50 mg/kg; EXT 100: plant extract at 100 mg / kg, VIT: vitamin E at 100 mg / kg. Values are mean \pm standard deviation (n = 6). ** p < 0.01; *** p < 0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

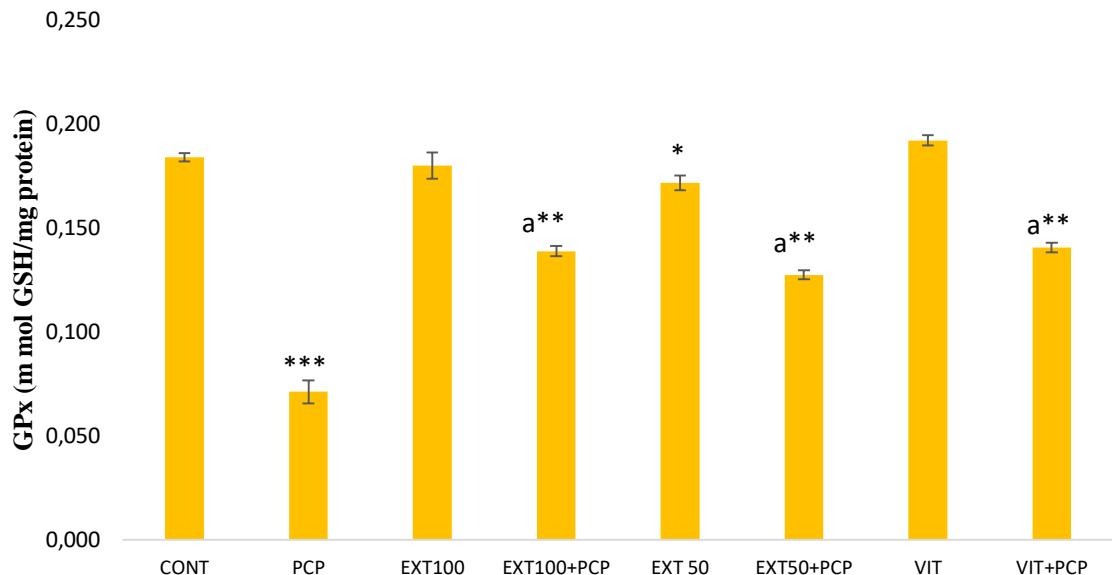


Figure 60: Effect of PCP, methanolic extract of *G. reboudiana* and vitamin E on GPx activity in kidney homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at 50 mg/kg; EXT 100: plant extract at 100 mg / kg, VIT: vitamin E at 100 mg / kg. Values are mean \pm standard deviation (n = 6). ** p < 0.01; *** p < 0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

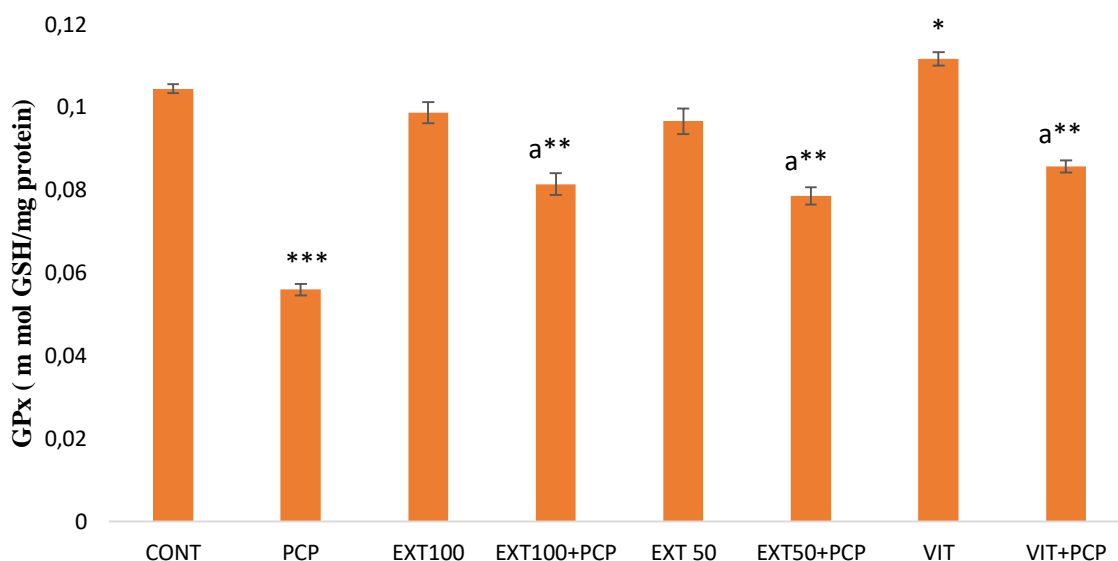


Figure 61: Effect of PCP, methanolic extract of *G. reboudiana* and vitamin E on GPx activity in heart homogenates. Cont: control group; EXT 50: plant extract at 50 mg/kg; EXT 100: plant extract at 100 mg / kg, VIT: vitamin E at 100 mg / kg. Values are mean \pm standard deviation (n = 6). ** p <0.01; *** p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

4.4 Results of Biochemical parameters

The effect of PCP on liver function is shown in Table (10). The results show a significant increase in serum levels of AST (p <0.01), ALT (p <0.05) and total bilirubins (p <0.01) compared to the control group.

Pre-administration of plant extract at 50 or 100 mg / kg or vitamin E significantly decreased the activity of AST (p <0.05), ALT (p <0.05) and the level of total bilirubins (p <0.05) compared with the group receiving PCP alone. Maintenance of serum levels of serum transaminases was shown in the groups treated with both doses of the plant extract and in groups with vitamin E.

A significant (p <0.01) increase in serum cholesterol and triglyceride levels was observed in PCP rats compared to the control group (Table 10). Whereas pretreatment with the plant extract, both singly or with vitamin E, significantly decreased serum (p <0.01) and triglyceride (p <0.01) levels.

Administration of PCP to animals caused a dramatic increase in serum urea (p <0.01) and creatinine (p <0.001). These serum parameters were significantly reduced in the rats treated with vitamin E (p <0.01) or with the extract of the plant at a dose of 100 mg / kg (p <0.01) (Table 10).

Table 10: Effect of PCP, methanolic extract of *G. reboudiana* and vitamin E on biochemical levels in rats. AST: glutamate oxaloacetate transaminases, ALT: glutamate pyruvate transaminases, CHO: cholesterol, TRI: triglycerides, URE: urea, CRE: creatines, T-BIL: total bilirubins. Cont: control group; EXT 50: plant extract at 50 mg / kg; EXT 100: plant extract at 100 mg / kg; Vit: vitamin E at 100 mg / kg. Values are mean \pm standard deviation (n = 6). ** p <0.01; ***p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

Analysis	CONT	PCP	EXT100	EXT 100+PC P	EXT 50	EXT 50+PCP	VIT	VIT+PCP
AST (U/L)	66 \pm 2,51	112,25 \pm 3,15**	71,5 \pm 2,06	79,33 \pm 0,89 a*	NM	NM	67,5 \pm 3	76,66 \pm 2,32 a**
ALT (U/L)	32,6 \pm 1,33	57,67 \pm 1*	35,66 \pm 3,74	40,5 \pm 1,37a*	30,6 \pm 2,80	43,5 \pm 0,46a*	30,5 \pm 5,4	47,8 \pm 1,81a*
CHO(mg/dL)	39 \pm 1,89	59,5 \pm 3,16*	40,8 \pm 2,53	42,67 \pm 3,23 a*	37,33 \pm 1,76	40,66 \pm 1,77a**	36,5 \pm 2,43	41,5 \pm 3,96a*
TRI(mg/dL)	99,67 \pm 1,17	130,83 \pm 0,23*	93,8 \pm 0,70	97,66 \pm 0,65 a*	93,33 \pm 0,36	93,167 \pm 0,46a**	95,5 \pm 0,77	99,83 \pm 0,64a*
URE (g/L)	0,351 \pm 0,56	0,648 \pm 0,31**	0,33 \pm 0,03	0,411 \pm 0,03 a*	NM	NM	0,353 \pm 0,05	0,406 \pm 0,03a*
CRE(mg/L)	5,925 \pm 0,56	12,305 \pm 0,31***	6,238 \pm 0,53	9,31 \pm 0,52 a*	NM	NM	5,7166 \pm 0,46	8,893 \pm 0,49 a*
BIL-T (mg/L)	6,00 \pm 0,27	12,043 \pm 0,17**	5,016 \pm 0,59	7,971 \pm 0,12 a*	NM	NM	5,1683 \pm 0,44	8,268 \pm 0,51 a*

4.5 Evaluation of body weight of animals

Figure (62) shows the percentage of animal weight changes during the experiment. The results show a normal increase in body weight in the rats treated with the extract and vitamin E in the control group.

The percentage change in weight of the PCP-fed rats was stabilized (8%) from the 7th day of treatment with a significant decrease (p <0.01) in that of untreated rats. Body weight is regularly standardized in rats pre-treated with the extract in two different doses (50 or 100 mg / kg) or with vitamin E with a significant increase (p <0.01) compared to that of rats receiving the PCP.

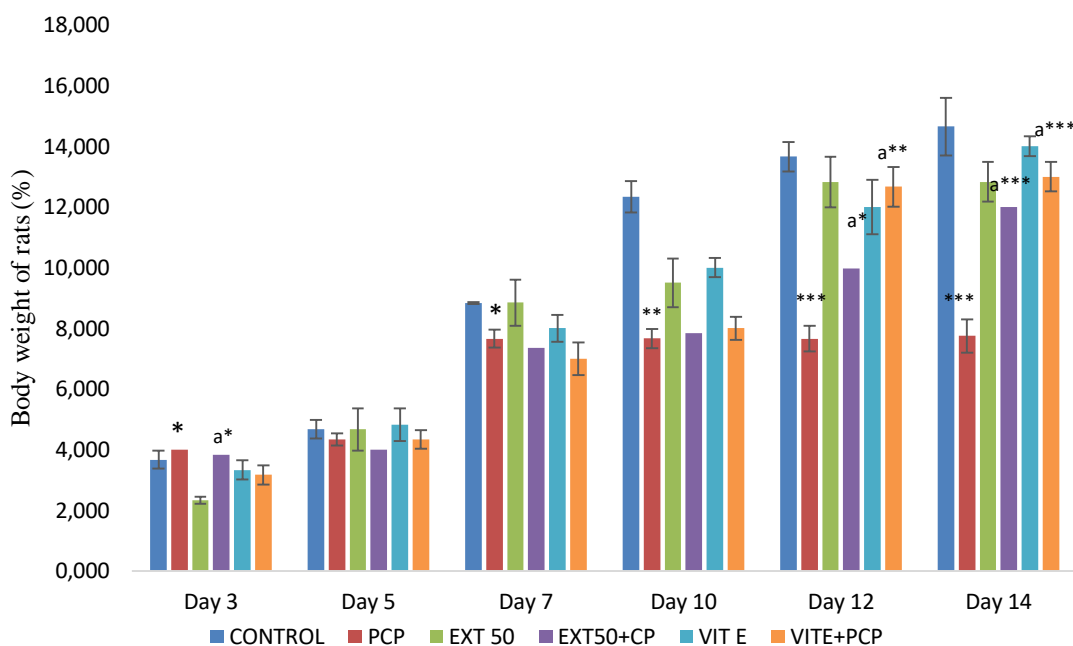


Figure 62: Effect of PCP, methanolic extract of *G. reboudiana* and vitamin E on the weight of rats. Cont: control group; EXT 50: plant extract at 50 mg/kg; EXT 100: plant extract at 100 mg / kg, VIT: vitamin E at 100 mg / kg. Values are mean \pm standard deviation (n = 6). ** p <0.01; *** p <0.001, compared to control group. a: compared to PCP group.

5. Conclusion

Antioxidants in ordinary products offer various capabilities to protect and defend oxidative lesions by clogging or blocking free radicals. For this reason, this study is carried out to evaluate the protective and antioxidant effects of the *G. reboudiana* plant by examining its methanolic extract.

The antioxidant possessions of this extract are revealed by its very high conception of phenols and flavonoids. This allows it to act significantly as a potent reducer, a Fe^{+2} chelator, a free radical scavenger and a lipid peroxidation inhibitor in comparison with antioxidant standards under the same conditions. In addition, this extract exhibited significantly weak protection against oxidative damage to H_2O_2 -induced plasmid DNA. But, this extract does not have antiproliferative effects against both C6 and HeLa cell lines.

Following our *in vitro* study, another *in vivo* experimental study was conducted to prove the effectiveness of this extract. Wistar Albino female rats were used in this study. Acute intoxication for 15 days was induced in rats with PCP at dose of 20 mg / kg b.w. Assays performed on the

homogenates (liver, kidneys and heart) of these rats show an increase in the level of MDA with a decrease in the level of GSH and the enzymatic activity of GPx. While the determination of serum biochemical parameters such as AST and ALT activity and total bilirubin, cholesterol, triglyceride, urea and creatinine levels showed a very significant increase, indicating liver damage. , kidney, heart, antioxidant system and an imbalance in the lipid profile of distinct cells.

On the other hand, co-treatment with the metanolic extract of this plant has provided powerful antioxidant, hepato-protective, nephro-protective and cardio-protective effects against PCP-induced toxicity, by reducing lipid peroxidation and particularly by decreasing the concentration of the harmful compounds resulting from this reaction in liver, kidney and cardiac homogenates such as MDA and consequently, the reduction of AST, ALT and total serum bilirubin levels and the normalization of cholesterol, triglycerides, urea and creatinine in the serum. The antioxidant properties of this extract were also revealed by the restoration of GSH level and GPx enzymatic activity in the various homogenates indicating its ability to act as a powerful antioxidant and protective of the function of these organs.

In conclusion, the metanolic extract of *G. reboudiana* plant is a powerful antioxidant contains a very important content of bioactive substance acts as a perfectly powerful protector structurally and functionally of some organs.

3 - Histological study

After sacrifice of rats, the organs -samples (of livers, kidneys and heart) were excised, rinsed with normal saline and processed distinctly for histological interpretations. The material was preserved in the fixative (10 % formalin) for 48 hours, dried by serial ethanol cycles (70 % to absolute) and placed in paraffin. The fragments were cut in 5 μm thinness which colored with Harris hematoxylin and eosin, and then observed using light microscopy (Leica DM 1000, Germany), at the laboratory of anatomical and pathological cytology, University Hospital Center. Constantine. Algeria.

1. Results

1.1. Histological study of livers

The histological photomicrographs of the hepatic sections of the groups co-treated with the different extracts or with vitamin E have a structure similar to that of the control group (Image 01), a normal architecture with normal central vein, polygonal hepatocytes, rounded nuclei and normal sinusoids (Image 03, 04, 05 and 06). Co-treatment with one of the extracts or with vitamin E provided maintenance of the liver structure and resistance against PCP by decreasing the structural changes induced by PCP.

Whereas the PCP-treated group demonstrated complete lesions of liver structure, dilation with congestion of the centrilobular vein and sinusoids, pyknotic liver cells with hepatocellular necrosis and binucleations (Image 02).

1.2. Histological study of kidney sections

Histological photomicrographs of kidney sections of PCP-treated animals showed renal lesions: interstitial and glomerular congestions, tubular dilatation, focal necrosis of the tubules, important glomerular and interstitial necrosis (Image 08).

While there were no changes in the kidneys of the control group (Images 07) and the animals treated with vitamin E (Image 08).

The histological observations observed in the rats cotreated with the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* at a dose of 50 mg / kg and the metanolic extract of the *G. reboudiana* plant at a dose of 50 and 100 mg / kg showed a less tubular dilatation and glomerular congestions plus edema. These observations are illustrated in the images (10) and (11) below, respectively.

1.3. Histological study of heart sections

The histological photomicrography of the control heart presented an architecture composed of bundles of striated muscle fibers (normal histology) (image: 12).

Although that of the group treated by PCP has demonstrated morphological changes in their architectures (Image 13). Cardiac lesions are minimal limited to congestion and edema with focal necrosis interesting rare myocardial cells (fibers).

In rats co-treated with either extract or vitamin E, the histological study showed congestions and edema in their core fragments, as shown in images 14 and 15.

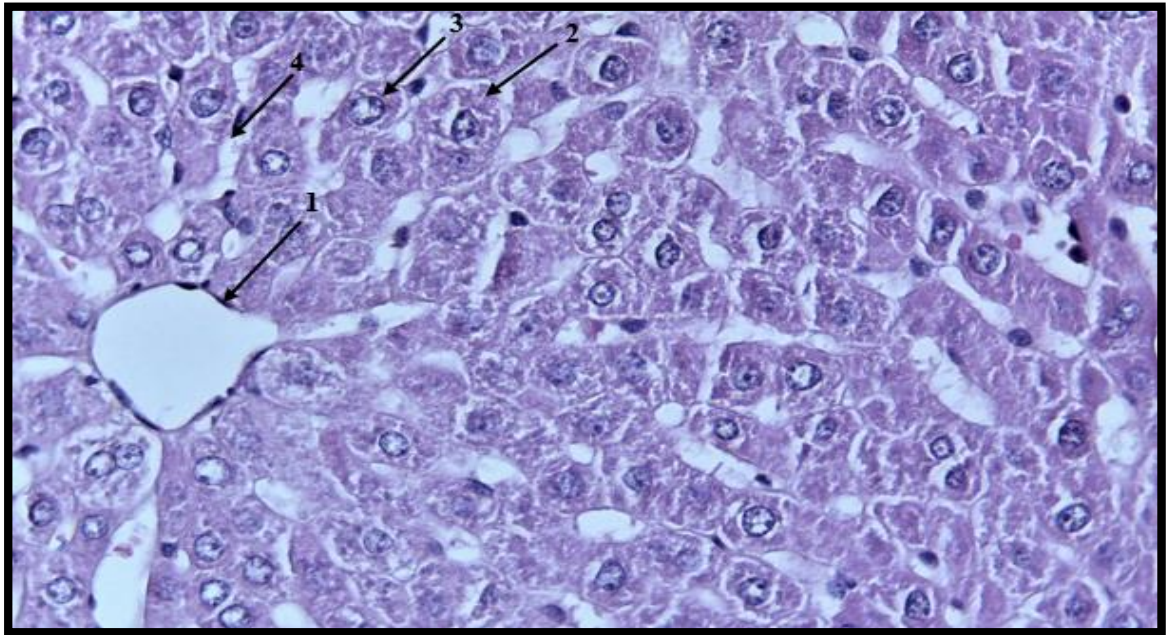


Image 01: Histological photomicrography of the liver of a control rat (X400).
 1: normal appearance with normal central vein, 2: polygonal hepatocytes, 3: rounded nucleus, 4: blood sinusoids.

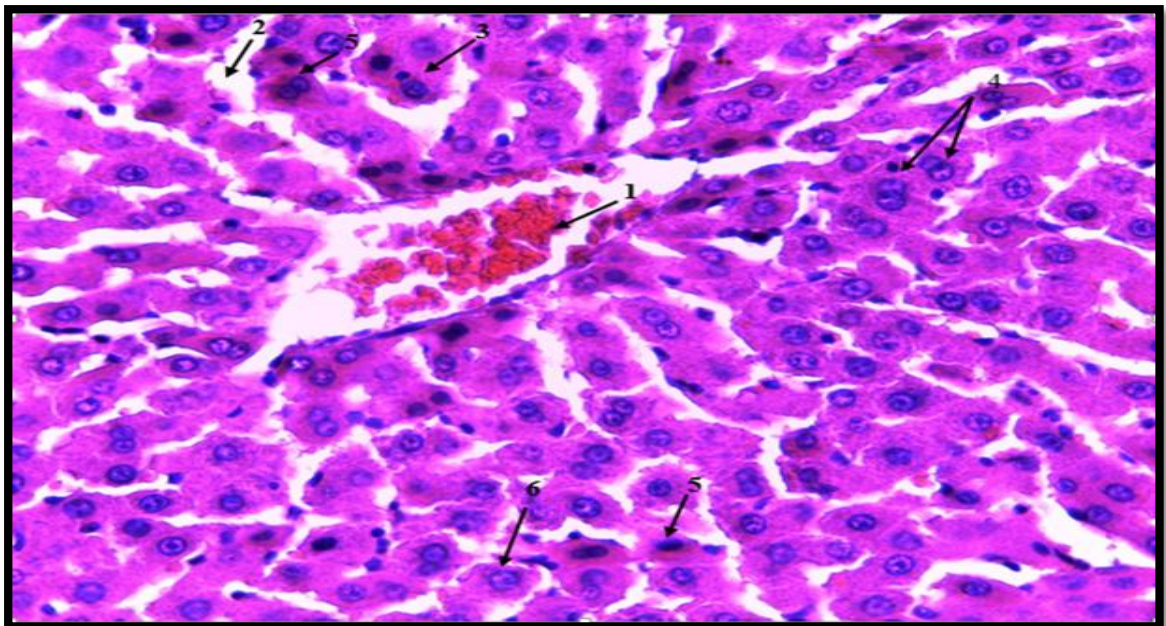


Image 02: Histological photomicrography of the liver of a rat treated with PCP at a dose of 20 mg / kg (X400).
 1: Dilatation and congestion of the centrilobular vein, 2: Dilatation of the sinusoids, 3: Pycnotic liver cells, 4: Binucleation of the hepatocytes, 5: Hepatocellular necrosis, 6: Bloating of the hepatocytes.

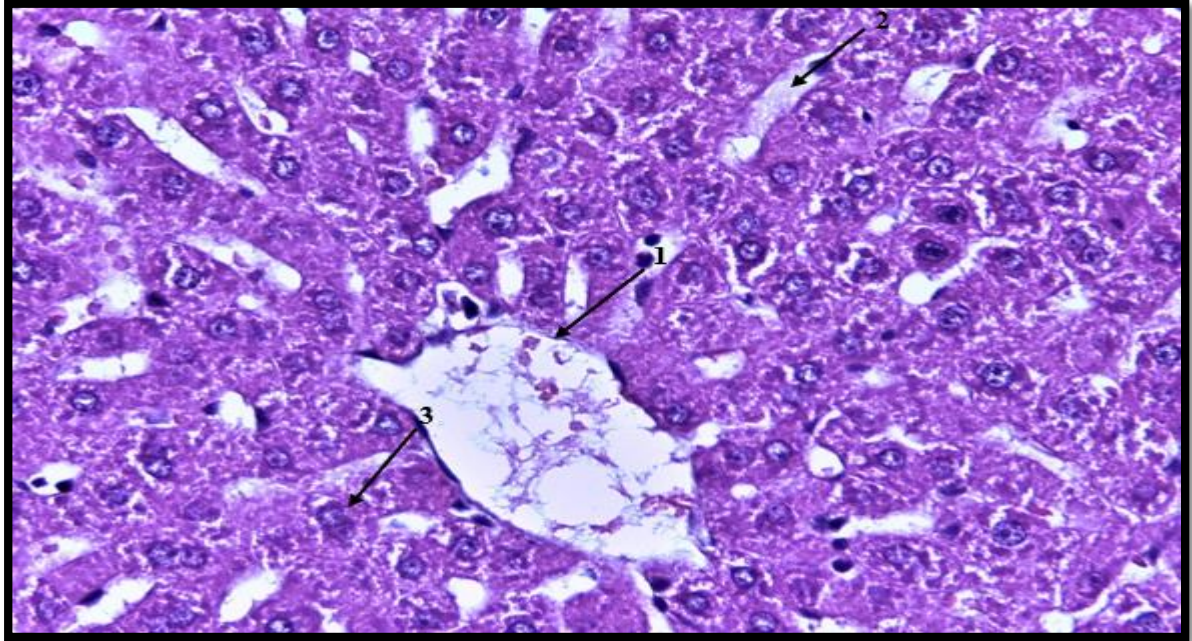


Image 03: Histological photomicrography of the liver treated with *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* at a dose of 50 mg / kg and PCP at a dose of 20 mg / kg (X400).

1: Dilatation and edema of the centrilobular vein, 2: Less dilation of the sinusoids, 3: Binucleation of the hepatocytes.

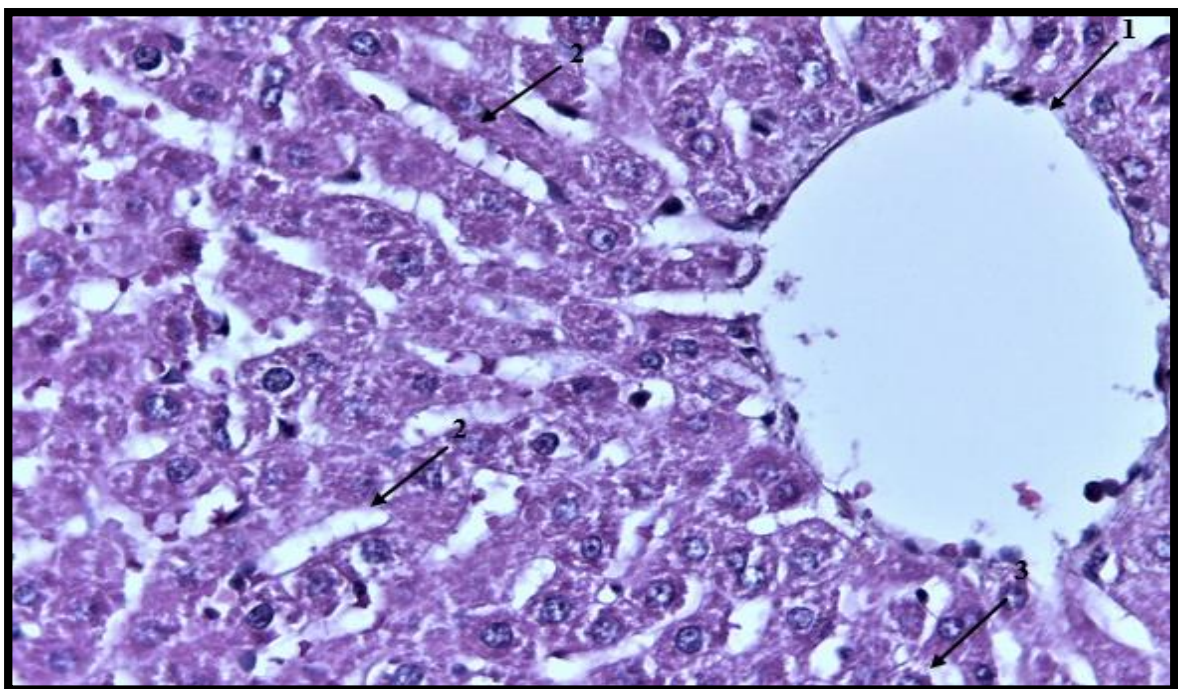


Image 04: Histological photomicrography of the liver treated with vitamin E at a dose of 100 mg / kg and PCP at a dose of 20 mg / kg (X400).

1: Less dilation of the centrilobular vein, 2: Less dilation of the sinusoids, 3: Bloating and clarification of the hepatocytes.

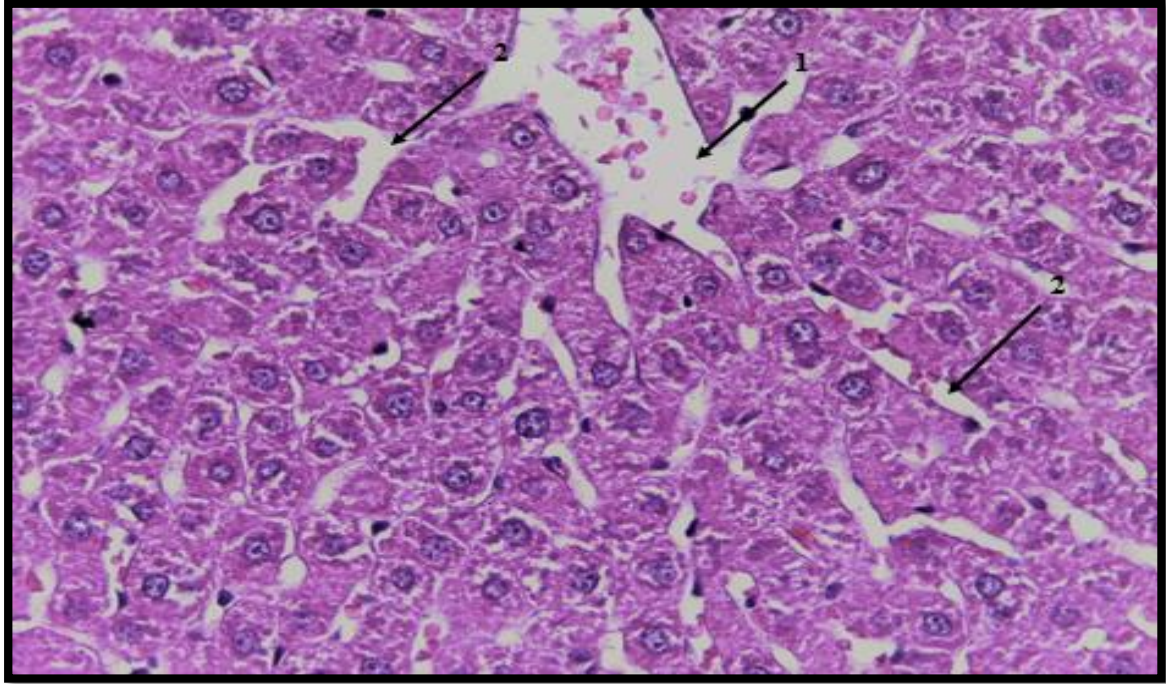


Image 05: Histological photomicrography of the liver of a rat treated with the metanolic extract of the *G. reboudiana* plant at a dose of 50 mg / kg and PCP at a dose of 20 mg / kg (X400).

1: Less dilation and congestion of the centrilobular vein, 2: Less dilation and congestion of the sinusoids.

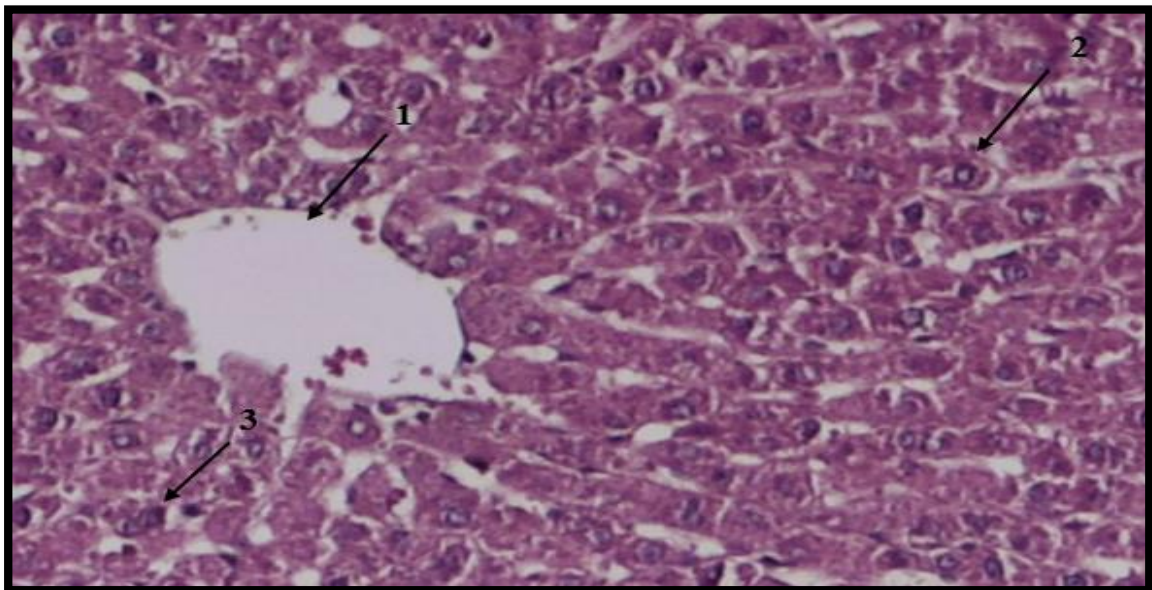


Image 06: Histological photomicrography of the liver of a rat treated with the metanolic extract of *G. reboudiana* plant at a dose of 100 mg / kg and PCP at a dose of 20 mg / kg (X400). 1: Less dilation of the centrilobular vein, 2: Ballooning and clarification of hepatocytes, 3: Binucleation of hepatocytes.

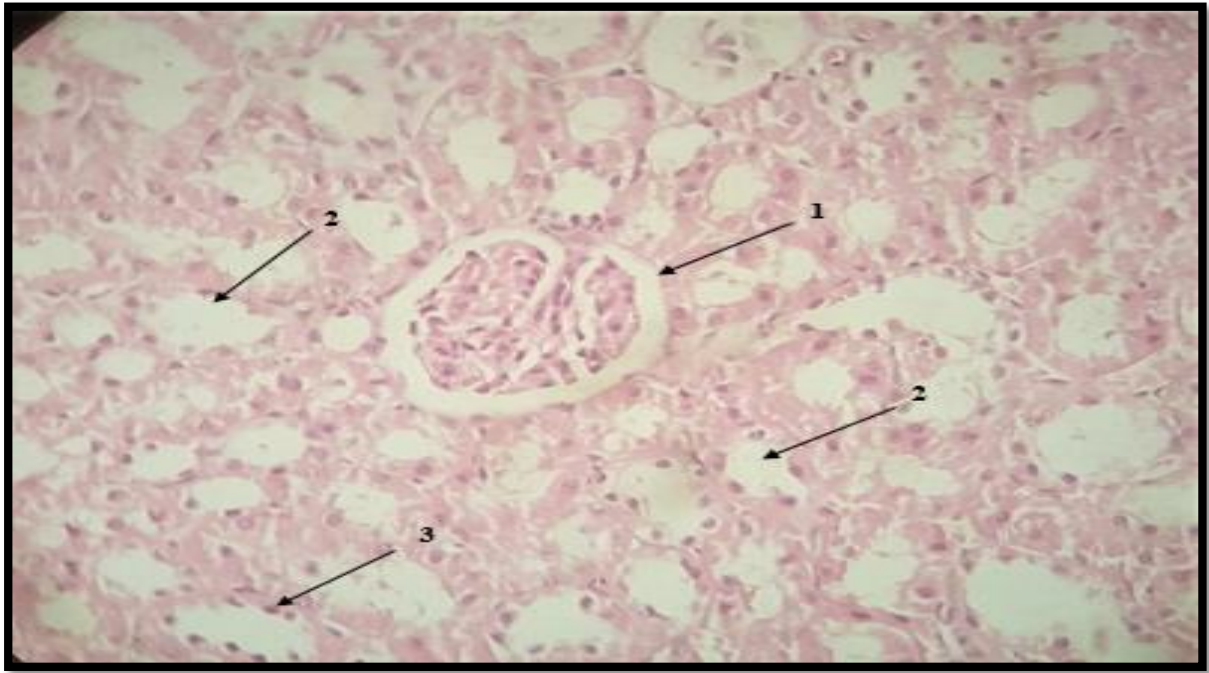


Image 07: Histological photomicrography of the kidney of a control rat.
Architecture conserved a normal appearance of glomeruli (1) and renal tubes (2) with single cubic epithelium (3).

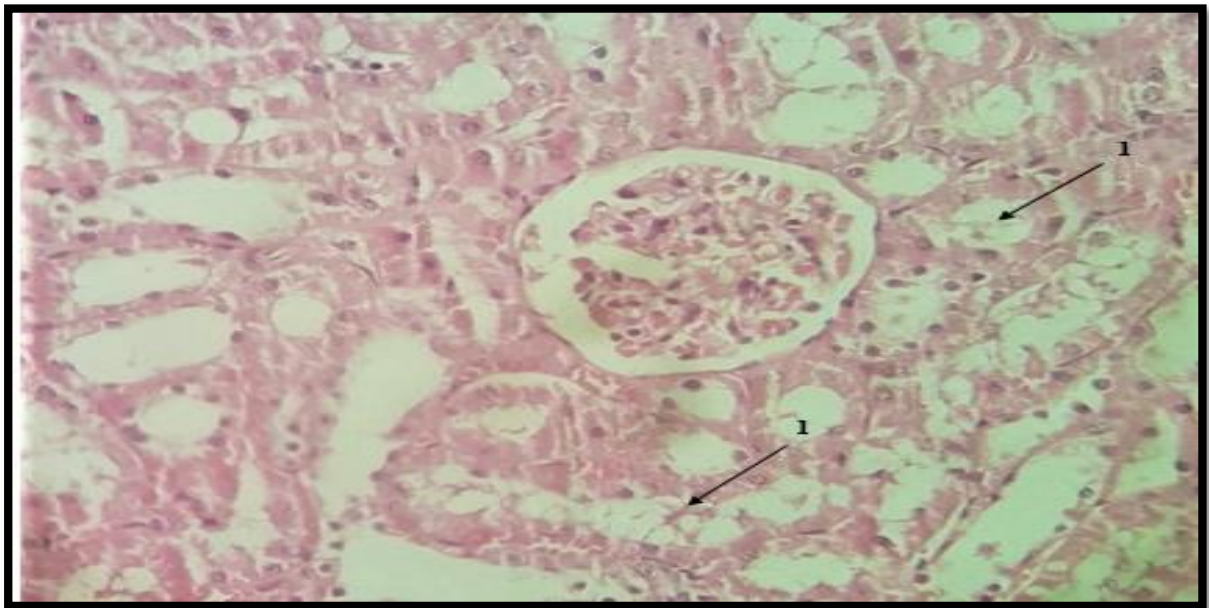


Image 08: Histological photomicrography of the kidney of a rat treated with vitamin E at a dose of 100 mg / kg (X400).
1: Normal architecture of glomeruli, with tubular dilatation.

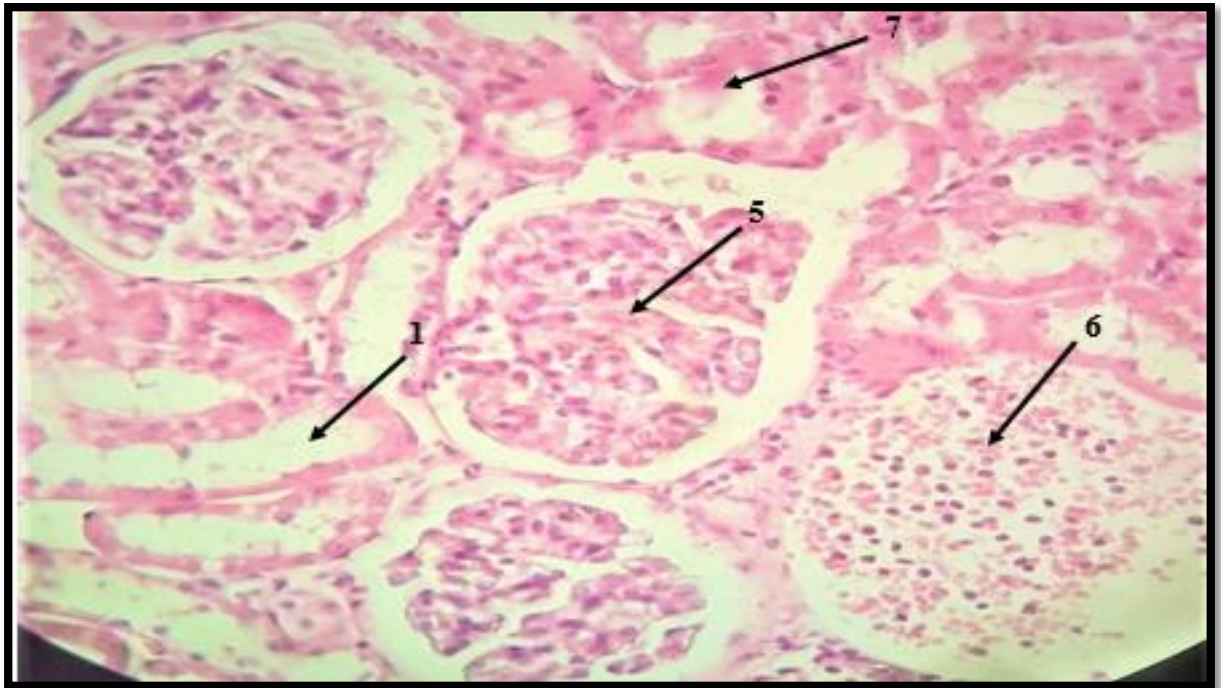
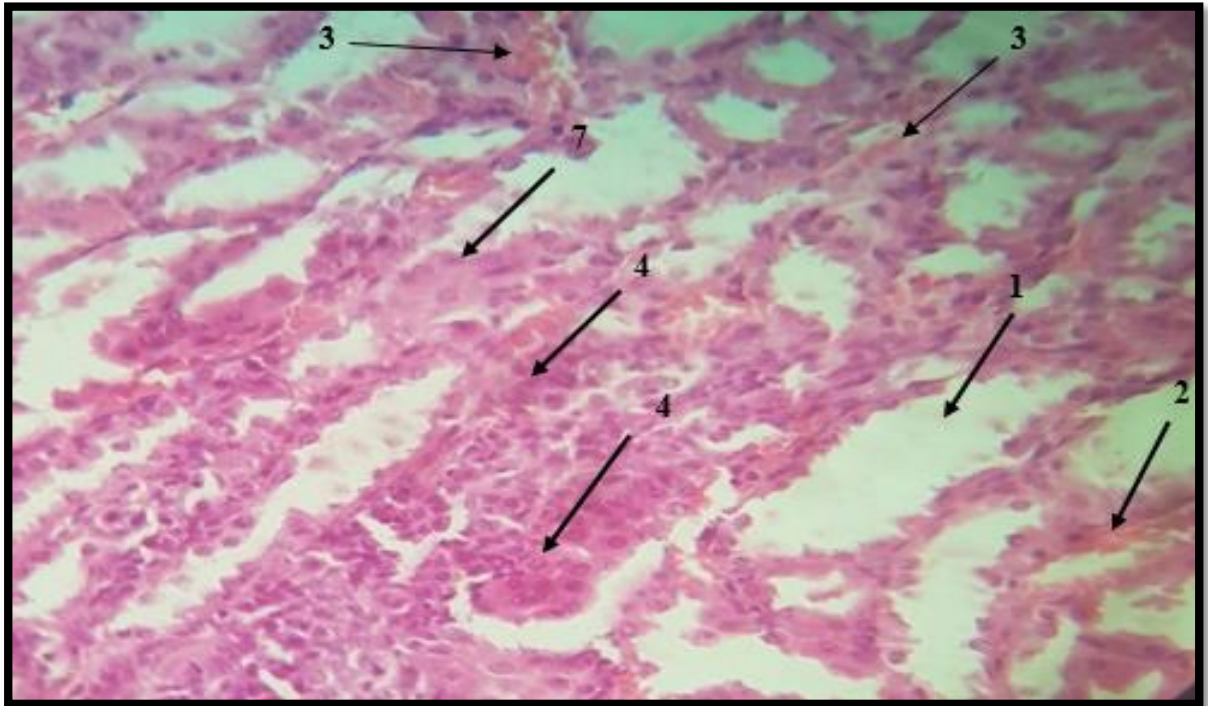


Image 09: Histological photomicrographs of the kidney of a rat treated with PCP at a dose of 20 mg / kg (X400).

1: Tubular dilatation, 2: Tubular necrosis, 3: Interstitial congestion, 4: Interstitial necrosis, 5: Glomerular congestion, 6: Glomerular necrosis, 7: Edema.

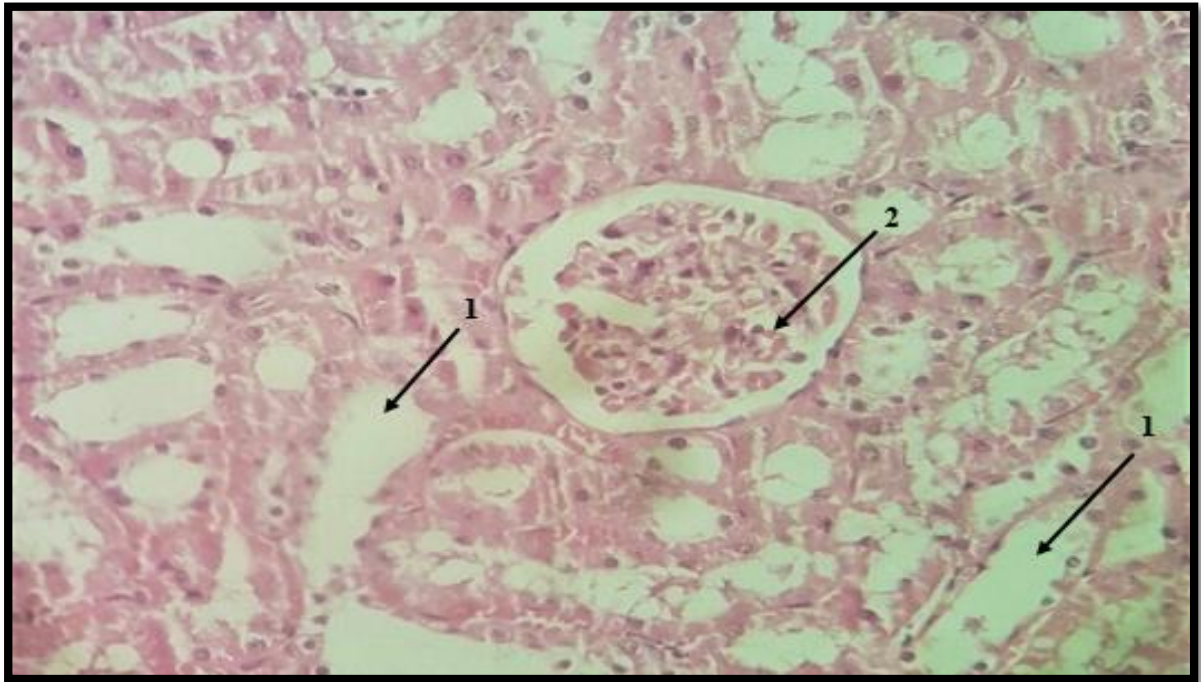


Image 10: Histological photomicrography of the kidney of a rat treated with the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* at a dose of 50 mg / kg kg and PCP at a dose of 20 mg / kg (X400).

1: Less ubular dilatation, 2: Less glomerular congestion.

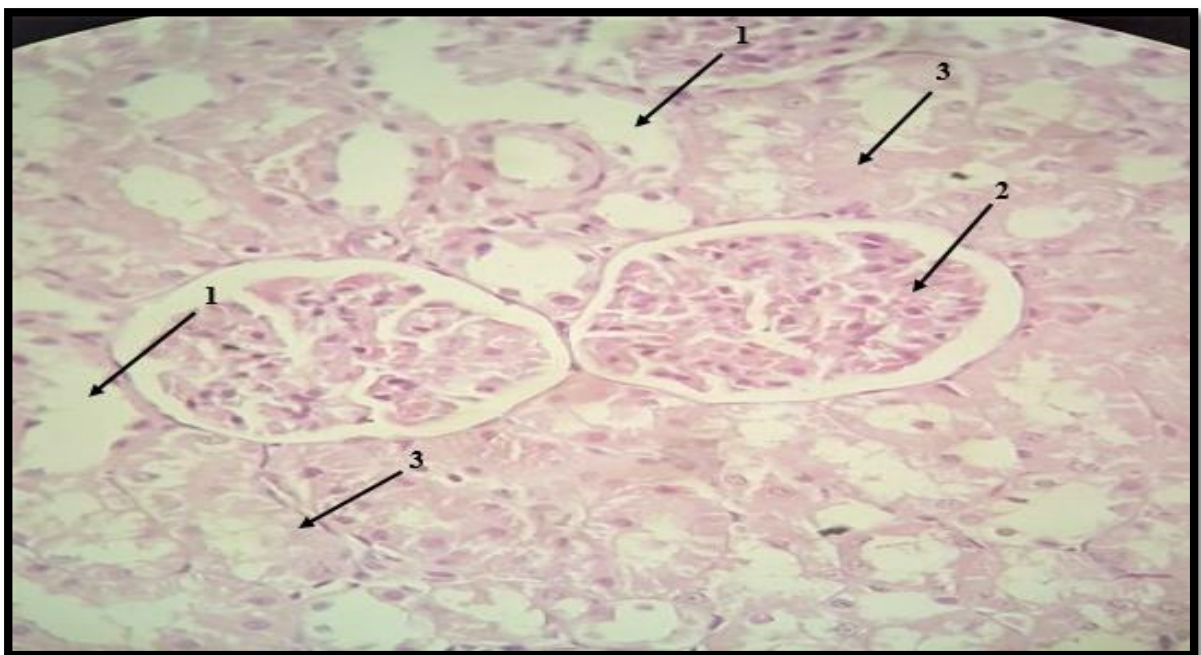


Image 11: Histological photomicrography of the kidney of a rat treated with the metanolic extract of *G. reboudiana* plant at a dose of 100 mg / kg and PCP at a dose of 20 mg / kg (X400).

1: Less tubular dilatation, 2: Less glomerular congestion, 3: Edema.

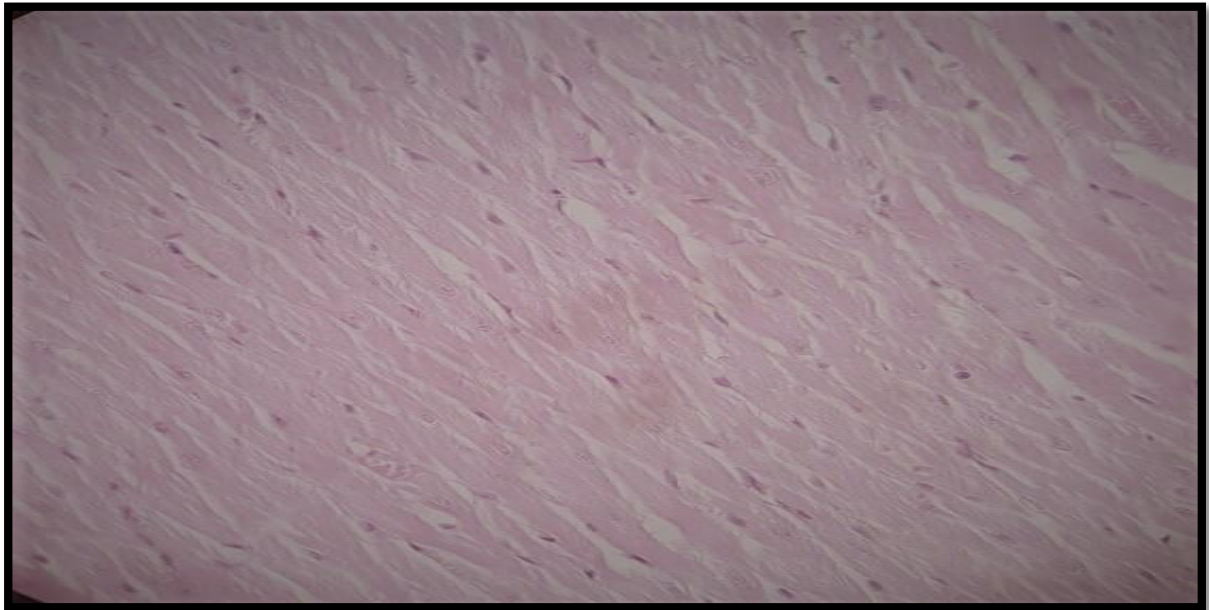


Image 12: Histological photomicrography of the heart of a control rat (X400).
Normal architecture with bundles of striated muscle fibers.

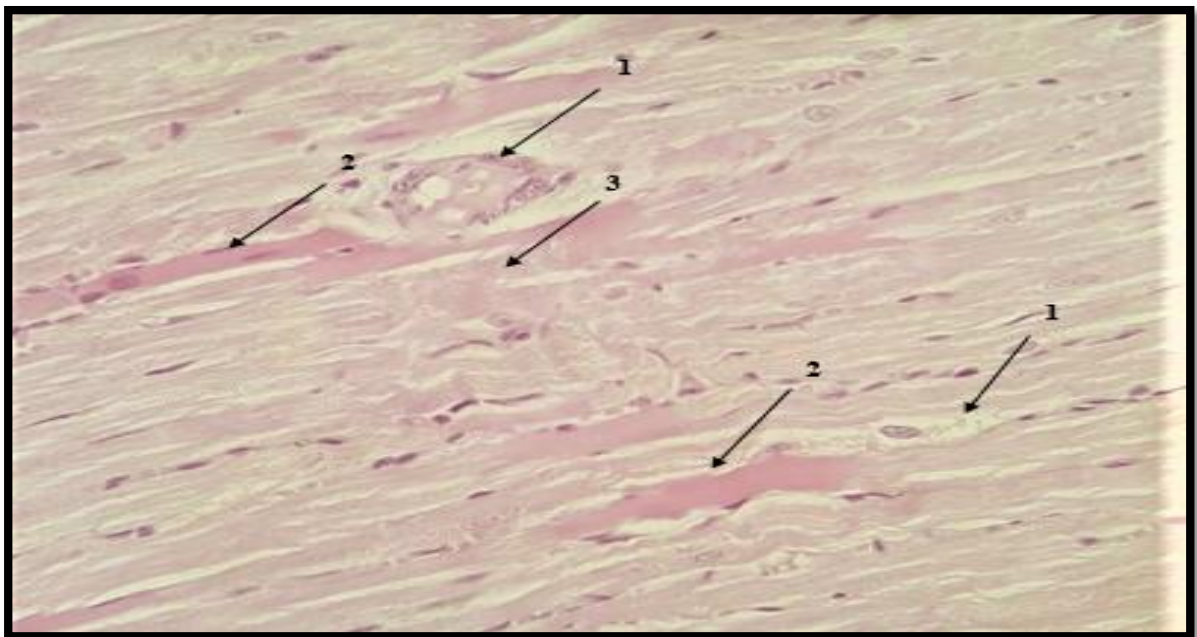


Image 13: Histological photomicrography of the heart of a PCP-treated rat at a dose of 20 mg / kg (X400).
1: congestion, 2: necrosis, 3: edema.

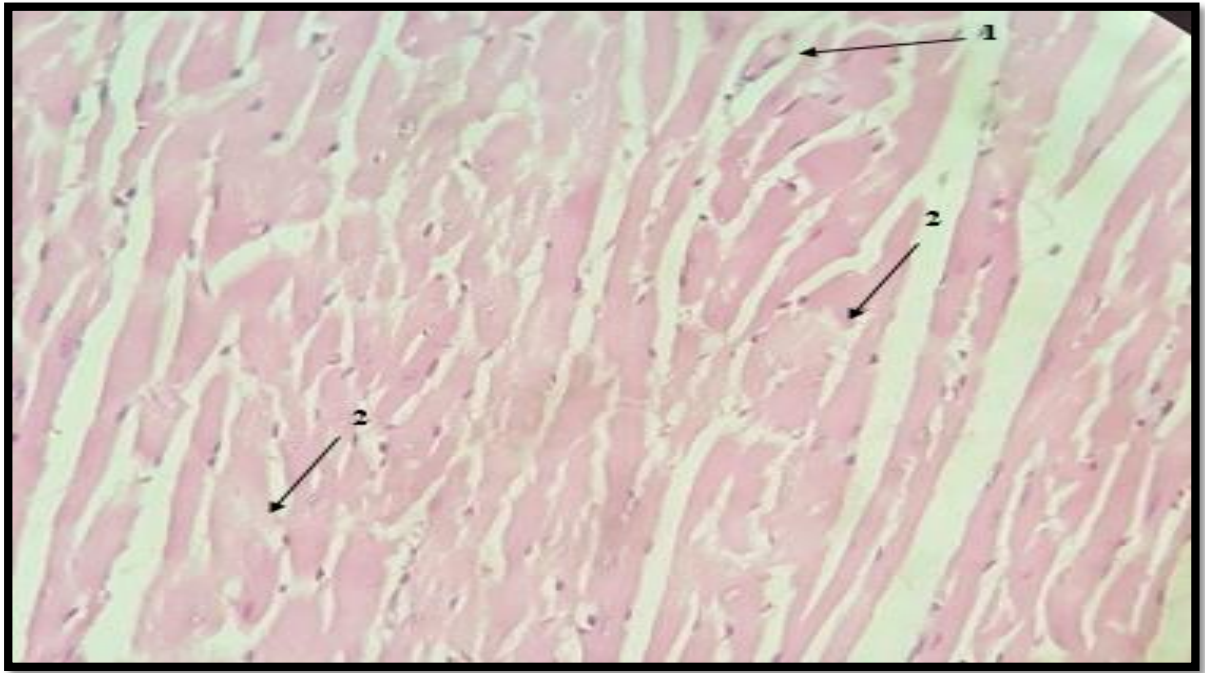


Image 14: Histological photomicrography of the heart of a rat treated with the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* at a dose of 50 mg / kg and PCP at a dose of 20 mg / kg (X400).

1: Less congestion, 2: Edema.

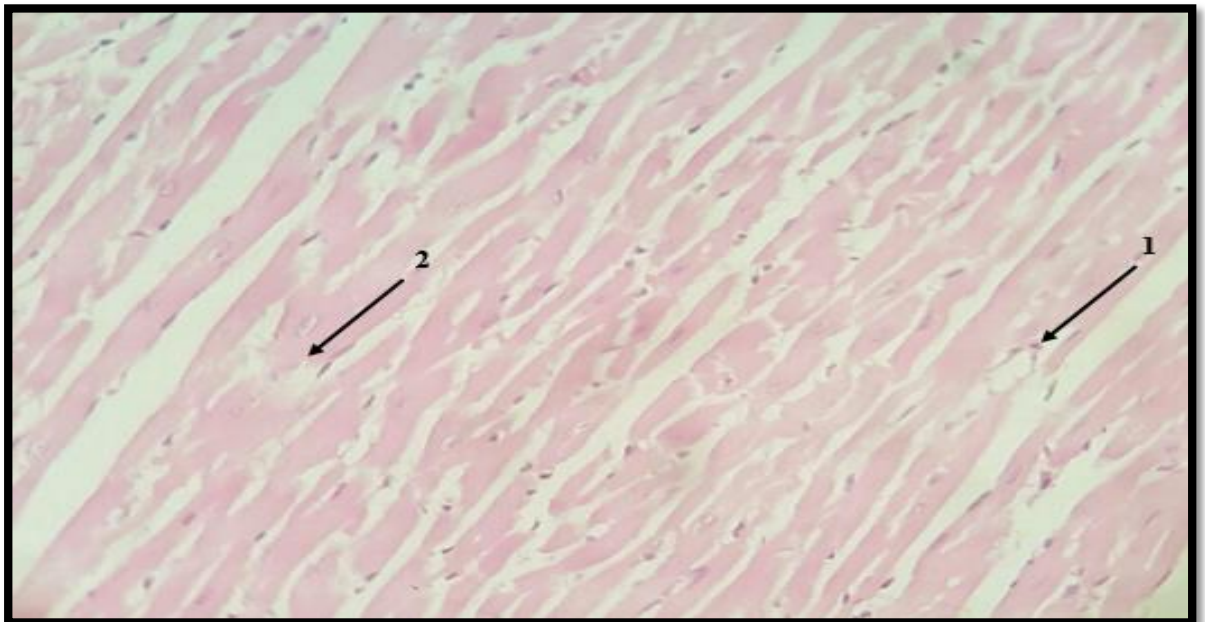


Image 13: Histological photomicrography of the kidney of a rat treated with the metanolic extract of *G. reboudiana* plant at a dose of 100 mg / kg and PCP at a dose of 20 mg / kg (X400).

1: Less Congestion, 2: Edema.

Discussion of *in vitro* and *in vivo* results: the protective effects of the two plants *P. coronopifolia* and *G. reboudiana*

The use of natural antioxidants, which can suppress oxidative damage, can be beneficial in preventing disease. Mechanisms of antioxidant action include suppression of ROS formation, either by inhibition of enzymes, or by chelation of trace elements involved in the production of free radicals, scavenging of reactive species and regulation or protection antioxidant defenses.

This study was designed to evaluate *in vitro* the content of phenolic compounds and flavonoids, the antioxidant activity, the oxidative protection against DNA damage and the anticancer activity of ethyl acetate extracts (EtOAc-PC) and *n*-butanol (*n*-BuOH-PC) of the plant *P. coronopifolia* and the methanolic extract (MeOH-GR) of the plant *G. reboudiana*. The *in vivo* antioxidant properties of the *n*-BuOH-PC extract and the MeOH-GR extract were studied according to its hepatoprotective, reno-protective and cardio-protective effect in female rats Albinos Wistar against the toxicity induced by PCP (pentachlorophenol).

Histological examination was completed to support previous studies. In the present study, the total phenol and flavonoid content of the EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC extracts as well as the MeOH-GR extract was measured as described in Materials and Methods, with a method commonly used to characterize botanical samples and estimate the total content of phenolic compounds in fruits, vegetables and plant extracts. These extracts showed a high content of these compounds. The fundamental role of phenolic content as a scavenger of free radicals is emphasized in many studies (Amrani et al, 2017a, Ali Demirci et al., 2018). Flavonoid compounds are the most essential plant elements because of their OH groups that can offer antioxidant capacity (Kumar et al., 2008).

In the present study, the antioxidant activity of distinct extracts was determined by the formation of a green phosphomolybdenum complex and compared to those of vitamin C and BHA as positive controls at the same concentrations 50-500 µg mL⁻¹. Antioxidant activity is mainly performed as an index for bioactive and functional therapeutic substances in nutrients. The antioxidant activity of the extracts is the result of the existence of polyphenols and flavonoids, which can eventually act by offering electrons and free radicals. Similar results were obtained by Barros et al. (2007) and Ozen et al. (2011) on their studies on deferent extracts. It has been shown that flavonoid compounds have potent antioxidant activity.

The extracts show that they can act as radical chain terminators that converts reactive free radicals into stable, nonreactive products. This is at the root of their ability to prevent lipid

peroxidation chain reactions. In addition, it has been reported that levels of phenolic compounds and flavonoids are related to antioxidant capacity and play a necessary role in stabilizing lipid peroxidation (Koldaş et al., 2015).

In order to show the antioxidant effects of our extracts, the present study focuses on several methods complying with the anti-radical power of these extracts. The reducing power shown by our extracts can be an important significant indicator of their potential antioxidant capacities. The results showed that the yellow color of the test solution changes to various shades of green and blue depending on the reducing power of the test sample, as studied by the potassium ferricyanide reduction method. This is the result of the reduction of Fe^{+3} -ferricyanide complex to Fe^{+2} . Therefore, Fe^{+2} can be verified by determining the creation of Perl's Prussain blue at 700 nm (Apak et al., 2016 ; Ozen et al., 20017a).

The literature has reported that the reducing capacity of products is commonly related to the existence of reducing agents such as antioxidant constituents (Özen, 2010). The high reducing capacity of our extracts and especially the extracts of the plant *P. coronopifolia* (EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC) can be the result of its effective amount of phenols and flavonoid compounds. Similar relationships concerning the reducing capacity of Fe^{+3} and polyphenols have been reported in the literature (Kada et al., 2017; Ali Demirci et al., 2018).

On the other hand, the effect of the extracts on the trapping of H_2O_2 is very important, which proves strongly that the extracts contain the substances necessary for the radical elimination. As a result, the ability of these two plants to trap the hydroxyl radicals directly results in inhibiting the progression of the lipid peroxidation system. Hydrogen peroxide is very essential because of its ability to cross bio-membranes. It is not dangerous on its own, but may very well be because of its ability to form hydroxyl radicals and be toxic to cells, thus highlighting the need for its removal. Indeed, it has already been suggested that dietary polyphenols prevent mammalian and bacterial cells against the cytotoxicity of hydrogen peroxide (Nakayama, 1994).

Clearly, the ability of our samples to trap hydrogen peroxide could be due to the presence of flavonoid compounds and phenols. Similar studies indicate that the elimination of hydrogen peroxide is very necessary for the prevention of the living process (Koldaş et al., 2015).

The free radical DPPH[·] receives an electron or hydrogen radical to be a stable diamagnetic element. The results of free radical scavenging potentials of the extracts and ascorbic acid were measured by the DPPH[·] method at different concentrations. The degree of discoloration from purple to yellow indicates the trapping potentials of the antioxidant extracts. It reacts with the

antioxidant and converts to DPPH₂ 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine, because of its hydrogen supply capacity (Jayaprakasha et al., 2004).

Therefore, the DPPH[•] test is commonly used as a parameter to evaluate the antioxidant capacities of natural antioxidants. The results indicate that free radical scavenging activity also increased with increasing concentrations of extracts.

Our data clearly indicate that our extracts have free radical inhibitory activity. But, extracts of the plant *P. coronopifolia* (EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC) have a power to trap free radicals often higher than that of the extractmetanolic of *G.reboudiana* plant (MeOH-GR). This result can be remarkable compared to the study by Boussaha et al., Which shows that this antioxidant capacity is associated with the existence of flavonoid compounds such as taxifolin, rhamnazine and the derivatives of the coffeoylquinic acid determined in this plant. (Boussaha et al., 2015). A very recent study has suggested that this very potent anti-radical activity against the DPPH[•] radical of the *P. coronopifolia* plant could be explained by the large quantities of certain major components such as γ -eudesmol, α eudesmol and cis-nerolidol in essential oils, aerial parts of this plant (Hamdouch et al., 2017).

In this study, the chelating activity of Fe⁺² of the extract was measured spectrophotometrically by the determination of ferrozine (Dinis et al., 1994). Ferrozine can form a ferrozine-Fe + 2 complex, effectively. This complex is disturbed by chelating compounds. As a result, the red color of the complex gradually disappears. As reported by Yamaguchi et al., 2000. The degree of red color reduction is predictive of the level of chelation capacity of the existing chelator metals (Yamaguchi et al., 2000). In the present study, standard extracts and antioxidants interfered with the formation of the ferrozine-Fe⁺² complex, suggesting that they have a chelating ability and capturing Fe⁺² earlier than ferrozine.

The formation of the ferrozine-Fe⁺² complex is disturbed in the presence of the extracts which indicates that they chelate the iron. The chelating capacity of the metals by the three extracts was increased by increasing the concentration. It has been reported that metal-band forming chelating compounds are lower antioxidants due to reduction of redox potential. On the other hand, it has been reported in the literature that iron can cause lipid peroxidation by reaction of Fenton, which can accelerate it by decomposition of hydroperoxideslipids into peroxy radicals (LO₂[•]) and alkoxy (LO[•]) which can capture hydrogen and propagate the formation of lipid peroxidation (Ayala et al. 2014).

In this study, it is suggested that the different extracts have very active chemical compounds giving antioxidant and effective properties, as shown by the OH[·] radical scavenging test. The three extracts have presented a very powerful anti-radical power vis-à-vis this radical. This one is higher by comparing to that obtained with vitamin C under the same conditions.

Lipid peroxidation is a chain reaction initiated by the extraction of hydrogen or the addition of an oxygen radical, resulting in the oxidative damage of polyunsaturated fatty acids (Yin et al., 2011). The resultant products of ROS-induced lipid peroxidation have very negative consequences for membrane enzymes and receptors, including MDA. This product is considered the compound completing the most performing membrane process (Yin et al., 2011).

In order to confirm the protective effects of the extracts against lipid peroxidation, another test was used in this study. This is the test for inhibition of non-enzymatic lipid peroxidation. This test was also carried out by measuring the MDA formed during the lipid peroxidation induced in the egg yolk homogenate, and excited by FeSO₄. The three extracts showed a remarkable inhibitory effect of the latter. Therefore, the extracts inhibited peroxidation by reducing the spread of MDA, reflecting the typical characteristics of a chain-breaking antioxidant, similar to the standard antioxidant (vitamin C).

ROs are known to have many damaging effects on the cells of the body. They seriously induce lesions in the DNA in the form of deletions, mutations and genetic effects. Natural products in medicinal plants can trap ROS generated by oxidative stress disruption (Guha et al., 2011). Various study results suggest that some plant extracts can protect DNA from oxidative damage by their antioxidant compounds (Arora et al., 2017). According to reports, plant extracts were practical to prevent DNA from oxidative damage induced by UV photolysis of H₂O₂ (Lassed et al., 2015).

In another way, the current study was based on the ability of the extract of the extracts of the plant *P. coronopifolia* (EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC) and the extractmetanolic of the *G.reboudiana* plant (MeOH- GR) to protect plasmid DNA 46966 against UV photolysis of H₂O₂-induced oxidation. Exposure of the plasmid to UV photolysis of H₂O₂ results in the production of hydroxyl radicals (OH[·]). These radicals are known to cause oxidative disruption of DNA strands, deoxyribonuclear fragmentation, base modification, lipid oxidation, and the generation of end products such as malondialdehydes and unsaturated aldehydes, which may be consistent with DNA and lead to mutagenic adducts (Chaudhary et al., 1994).

The electrophoretic result of the plasmid DNA 46966 proved that the extracts of the plant *P. coronopifolia* (EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC) exhibit complete protection of the plasmid DNA

(using UV photolysis of H₂O₂ and in the presence of 50 µg each extract) indicating that the damage of the plasmid DNA is caused by the hydroxyl radicals. The post-treatment with these extracts and even with MeOH-GR protects the plasmid DNA from the hydroxyl radicals generated by the UV photolysis of H₂O₂.

This study shows a significant correlation between the antioxidant potential and the trapping power of the radical hydroxyl on the one hand, and the protection of DNA on the other hand. These results suggest that inhibition of DNA loss by the different extracts of *P. coronopifolia* or *G. reboudiana* plant may be due to the high antioxidant capacity of these extracts revealed by the cumulative level of antioxidant activity, the reducing power, the trapping capacity of hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radical (OH[·]), the chelation tests of metals and the powerful power of inhibiting lipid peroxidation. As a result, our extracts can be powerful agents that provide total protection for DNA.

Currently, antiproliferative activities are widely studied for medicinal plants and other common sources (Demirtas et al., 2009, Yaghioglu et al., 2013). The anti-cancer property of EtOAc-PC, *n*-BuOH-PC and MeOH-GR extracts against HeLa cells and C6, which has been tested using the xCELLigence RTCA instrument, shows that compared to the positive control (5-Fluorouracil), the extract exhibited various anticancer effects at different concentrations. HeLa cells and C6 cells were inactivated only by the two extracts of the plant *P. coronopifolia* (EtOAc-PC, *n*-BuOH-PC). In addition, they underwent maximal inactivation up to a concentration of 250 µg mL⁻¹.

The potent activity of higher concentration could be due to chemical profiles like the high content design of polyphenols and flavonoid. While the decrease in this ability could be caused by the low ratio of bioactive molecule in the plant extract that has degraded over time, cells can grow after inactivation. These results are consistent with other studies that suggest that certain extracts of plants that have antioxidant potency are also potent inhibitors of the proliferation of HeLa and C6 cell lines at high concentrations (Lassed et al., 2017; Azzouzi, 2017).

The anticancer activity is widely studied on medicinal plants and other ordinary sources (Demirtas et al., 2009 ; Yaghioglu et al., 2013). Phytochemical and anticancer studies on plants *P. coronopifolia* and *G. reboudiana* have not yet been studied. The anticancer properties of the EtOAc-PC, *n*-BuOH-PC and MeOH-GR extracts against HeLa and C6 cells were tested using the xCELLigence RTCA instrument and compared to the positive control of 5-fluorouracil (5-FU). The extracts had different profiles at different concentrations.

HeLa and C6 cells were inactivated by the EtOAc-PC and the *n*-BuOH-PC extracts of the *P. coronopifolia* plant and showed maximum activity at high concentrations. Anticancer activity in higher concentration may be due to chemical profiles such as high content polyphenolic and flavonoid content. Phytochemical work on these extracts allowed the isolation and structural identification of several types of secondary metabolites. As well as HPLC analysis has highlighted the presence of several phenolic acids in extracts of the aerial part of the plant *P. coronopifolia* (Azzouzi, 2017 ; Lassed et al., 2017 ; Ozen et al, 2017a ; Agina et al., 2018).

However, the MeOH-GR extract virtually lost its ability to inhibit the cell proliferation of the lines studied within a few hours after its injection which rises that it does not have an inhibitory activity against the cancer cell lines by compared to 5-FU, despite its content is suitably important in polyphenols and flavonoids. This may be due to the low ratio of bioactive biomolecules in this extract, then to the proliferation capacity of these cells after a few hours of blockage. Various studies have suggested that this may also be due to the non-coincidence between the structure of flavonoids in some extracts and that of flavonoids that excrete antiproliferative properties (Batra and Sharma 2013, Sak, 2014).

Another study suggests that the low activity of some extracts could be explained by the glycolization of these flavonoids which can prevent their access in cancer cells. Flavonoids can be cytotoxic, but this action depends either on their glycolization and their degree of methoxylation or concentration and the type of cell being treated (Azzozi, 2017).

In order to assert the antiproliferative properties of our extracts against the C6 and HeLa cell lines, the BrdU cell proliferation ELISA was carried out, but just for the EtOAc-PC plant extract of *P. coronopifolia* and the MeOH- GR of the plant *G. reboudiana*. This test showed that even more the dose is higher than the antiproliferative effect is increased (depending on the dose dependent). Higher activities were observed against C6 cell lines at higher concentrations (via 5-FU), but the same observations were not obtained against HeLa cell lines.

The antiproliferative activities of the extracts EtOAc-PC and MeOH-GR as well as 5-FU which are also expressed in terms of IC₅₀ and IC₇₅ have indicated that they are the most active C6 lines and the EtOAc-PC extract shows superior activities against These differences in antiproliferative activity between extracts depend on their phytochemical composition, the nature and concentration of their phenolic compounds, degree of anti-cancer cell activity and the potency of these cells against certain anticancer agents.

Lactate dehydrogenase (LDH) is a stable cytoplasmic enzyme found in all cells. It is rapidly released into the supernatant of the cell culture or into the blood when the plasma membrane of the cells is damaged. For this reason, LDH test is a widely used test as a quantitative test for the toxicity of various drugs and cell molecules (Kumar et al., 2014).

On the other hand, the EtOAc-PC and MeOH-GR extracts do not show cytotoxic effects by adding 5-Flu. This certifies that the EtOAc-PC extract exerts an anticancer and antiproliferative effect against C6 and HeLa cells without any cytotoxic effect observed by the lactate dehydrogenase (LDH) leak test.

Xenobiotics such as pesticides have been able to produce ROS, which sometimes causes oxidative stress in various tissues (McDonough 2003; Rai et al., 2007; Mehta et al., 2009). The richness of phenols and flavonoids, the antioxidant potential and the ability to inhibit oxidative damage such as DNA damage and lipid peroxidation, are the main factors we are encouraged to highlight the antioxidant capacity *in vivo* of these extracts and seek the protective power of these extracts against poisoning induced by xenobiotics, particularly by PCP.

Several *in vivo* complementary methods were performed in this study. These methods made it possible to evaluate the protective effect of the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* and the metanolic extract of the *G. reboudiana* plant on the maintenance of the antioxidant system against xenobiotics. This effect has been demonstrated by animal experiments inducing acute intoxication in adult rats by PCP.

Ingestion of PCP for two weeks with a dose of 20 mg / kg caused very significant functional alterations in the livers, bees and hearts of rats. This dysfunction of these organs is evidenced by the significant increase in the level of MDA, one of the main products resulting from the lipid peroxidation, by the decrease in the activity of antioxidant enzymes such as GPx and by the decrease GSH levels in the homogenates of these organs compared to those of the control group.

In these experiments, administration of PCP (20 mg / kg for 15 days) induced an increase in ROS following a stress disorder in rats. Acute liver, kidney and heart disorders and severe changes in these organs. Previous studies have shown that pesticides, and especially PCP, increase MDA levels in various rat tissues compared to healthy models (Dong et al., 2009; Han et al., 2009; Angela et al, 2012; Zhou et al., 2013). Pesticide-related damage has persuaded frequently-known and extra-valued lipid peroxidation in experimental trials to understand the cellular mechanisms of oxidative injury and to estimate the beneficial potential of dietary remedies and antioxidants (Zhou et al., 2013).

Oxidative stress in all three organs has been exacerbated by PCP since a significant decrease in GSH levels. The reduction of GSH promotes the formation of ROS and oxidative stress with a cascade of changes in the structural and possibly functional state of cells and membrane organelles.

The main role of GPx is the reduction of soluble hydrogen peroxide and alkyl peroxides and the decomposition of H₂O₂ into water, using GSH as a substrate (Bebe and Panemangalore, 2003). The reduction of this substrate is linked to an inhibition of the GPx action. This reduced GSH, in addition to GPx and GST (glutathione-S-transferase) is responsible for GSH redox cycles that maintain the redox status of tissues against oxidative destruction persuaded by ROS and also protect their structural and regulatory proteins. Free radicals are complicated in oxidative disorders by encouraging PCP-induced liver, kidney and cardiac impairment, as evidenced by the significant reduction in GPx activity.

On the other hand, previous research has reported that quinones and semiquinones (products of PCP metabolism) are electrophilic and can be fixed with macromolecules in cells. This could disrupt the plasma membrane and increase its permeability and cause damage to the electrical system (Shan et al., 2013). This leads to the production of superoxide anion and hydrogen peroxide at a very high rate which increases the oxidative damage. This may well induce changes in the enzymes involved in oxidative phosphorylation (Zhou et al., 2013).

In addition, the reduction in the level of lipid peroxidation in the groups treated with extracts could be due to the increase in antioxidant status, resulting in an increase in GPx activity and GSH concentration compared to the control group. It has been reported that if CAT and GSH activities are not sufficiently amplified to metabolize hydrogen peroxide, this can lead to increased levels of hydrogen peroxide and TBARS and disrupt the typical role of cells.

Induction of oxidative stress indicate that these extracts can improve the baseline defense mechanism against possible oxidative stress, thus decreasing susceptibility to oxidative stress-related diseases such as cardiovascular diseases. , liver and kidney.

However, pretreatment with the *n*-BuOH-PC extract and the MeOH-GR extract as well as with vitamin E (before the induction of oxidative stress) decreases the concentration of MDA, indicating their anti-lipoperoxidant effect due to of their powerful antioxidant and anti-radical capacities, and thus a bio-membrane restoration of hepatic parenchyma cells with a prevention of the renal and cardiac function. In addition, pretreatment with these extracts normalized glutathione levels and GPx activity in different tissues, which may be due to de novo synthesis and / or regeneration of GSH via glutathione reductase activation and inhibition of free radical formation

(Nasir et al., 2013; Agina et al., 2018). These consequences qualify the biological importance of these extracts, including the prevention of the redox cycle of glutathione and also the direct purification of ROS.

Numerous studies have shown that after administering foods rich in polyphenols, the level of oxidative stress and the improvement of antioxidant status were mainly based on the reduction of TBARS levels and the inhibition of ROS formation (Boaventura et al., 2013). As a result, the observed antioxidant effect may be due to the synergistic action of bioactive compounds present in these extracts and the high content of polyphenols, highlighting the influence of these antioxidants in the diet on human health.

PCP-induced hepatic dysfunction is revealed by a significant increase in AST, ALT and total bilirubin, which are biochemical signs of liver damage.

Increased ALT enzymes were due to the destruction of liver structure. From the moment this enzyme is contained in the cytoplasm, it will be moved to the bloodstream after a cellular change causing an increase in its concentration. While, the increased concentration of AST enzymes indicated that the administration of PCP to rats causes damage in both plasma membranes and organelles, which is complemented by the structural and functional adjustment of mitochondria. This result is confirmed by other results (Nishimura et al., 1980; Villena et al., 1992).

Bilirubin is a molecule produced during the degradation of hemoglobin (degradation of red blood cells). At first it is said free, not soluble in water, it is transported by albumin and reaches the liver where it is conjugated with lipidic groups and takes the name of conjugate. It is eliminated in the stool. Subacute and chronic studies in rats receiving PCP showed that their excretions were greatly increased by porphyrin, the precursor molecules of heme. (Fleischer, 1980; Wainstock and Martin, 1980). It is the result of a destruction of hemoglobin, a storage of the heme and consequently a production of bilirubin. According to the study by Pico et al., 2006, pesticides are able to bind with hemoglobins and essentially with albumin. Pesticides decrease the production of albumins (Singh and Singh, 2014). Thus, the increase in total bilirubin levels following ingestion of PCP is the result of hemoglobin degradation, decreased albumin production and the end of a PCP binding with albumin itself reducing its role transporter (free form) of bilirubin.

In addition, creatinine is one of the waste materials, the breakdown of proteins in the body, filtered in the kidney glomerulus and excreted in the urine. The glomerulus is sensitive to creatinine accumulated more in the bloodstream and will be unable to suppress it. This accurately reflects kidney failure. But, it is taken into account with the evacuation of blood urea, molecules

also comes from the degradation of proteins. The level of urea depends both on renal function, protein intake, and the destruction of the body's proteins.

Biochemical examination in the sera of these rats receiving PCP revealed an increase in urea and creatinine levels in the latter indicating protein degradation and consequently renal dysfunction. On the other hand, the pretreatment of the rats with extracts shows that they are also able to reduce the concentrations of urea and creatinine, in the serum of rats poisoned by PCP.

Thus, normalization of serum ALT, AST, serum bilirubin, urea, and creatinine levels suggests stabilization of the endoplasmic reticulum by pretreatment with these extracts, leading to protein synthesis in the liver. Stimulation of protein synthesis has been advanced as a protective mechanism contributing to accelerate cell regeneration. This study suggests a hepato and nephroprotective effect of these extracts against the acute toxicity induced by PCP.

In addition, the present study mentions a significant increase in serum cholesterol and triglyceride levels in the PCP group compared to the control group. This finding may suggest that the administration of PCP has caused changes in the lipid profile, which can lead to swelling of liver cells. Progression of hepatic steatosis is making an important mechanism that increases the substrate source for esterification of fatty acids, directly motivated the esterification pathway as well as decreased hepatic transfer of triglycerides such as very low density lipoproteins (VLDL). While in co-treatment with extracts from both plants or with vitamin E, cholesterol and triglyceride levels were significantly decreased in serum, due to their dominant inhibition of lipid peroxidation.

Also, the current study mentions a significant increase in cholesterol and triglyceride levels in the serum of PCP group compared to the control group. This finding may suggest that administration of PCP caused changes in the lipid profile, which may lead to ballooning of hepatic cells. The progress of fatty liver is doing through important mechanism which augmented substrate source for the esterification of fatty acids, motivated directly the esterification way as diminished also the hepatic-triglyceride transfer like the Very-Low-Density Lipoproteins. While, in the co-treatment with plant extract or vitamin E, the cholesterol and triglyceride levels were significantly decreased in serum, due to their dominant inhibition of lipid-peroxidation.

Thus, normalization of serum ALT, AST, serum bilirubin, urea, and creatinine levels suggests stabilization of the endoplasmic reticulum by pretreatment with these extracts, leading to protein synthesis in the liver. The stimulation of the lipid, lipoprotein and protein degradation marked in the different homogenates and sera explains the weight loss reported during the test period.

Histopathological observations of liver fragments from untreated animals indicated a typical hepatic lobular structure and cellular arrangement. Although that of the group treated with PCP revealed complete structural lesions. This finding is consistent with the results of Agha et al., 2013. Other studies have confirmed that rats exposed to PCP-induced intoxication exhibited adverse histological changes such as bloating, vacuolization, degeneration, cell necrosis, perioral fibrosis, hepatic hypertrophy, etc. (Villena et al., 1992; ATSDR, 2001; Abhay and Sunanda, 2015).

In the case of rats pretreated with the *n*-BuOH-PC extract, the MeOH-GR extract and with vitamin E, a normal hepatic architecture was observed with a slight degree of dilation of the centrilobular vein. Clearly, these data indicate the protective effect provided by both extracts and vitamin E by preserving the activities of antioxidant enzymes and inhibiting lipid peroxidation in rats. These findings are consistent with the results of (Villena et al., 1992; Agha et al., 2013).

The damage of certain myocardial cells has been characterized by interesting focal necrosis. Necrosis represents the dominant PCP-induced death pattern in different systems (Villena et al., 1992; Wang et al., 2000; Chen et al., 2004; Fernández et al., 2005; Agha et al., 2013). Abhay and Sunanda, 2015). High intensity oxidative stress can overwhelm the antioxidant potential and induce the opening of the transition pore and mitochondrial permeability. Non-selective permeability of the inner membrane, which can lead to necrotic and apoptotic cell death (Lushchak, 2011).

The histological study of fragments of the livers, kidneys and hearts of the rats pre-treated with these extracts has shown that it is capable of conserving the hepatic, renal and cardiac architecture against the damage induced by PCP. This ability to protect and preserve tissue may be provided by the large composition of polyphenolic content and flavonoids. Many studies suggest that polyphenols have the capacity to regulate a variety of cellular and molecular processes by interaction with protein targets (enzymatic proteins, intracellular signaling proteins, nuclear receptors, etc.) (Amiot et al., 2009).

Les polyphénols comprennent les acides phénoliques, sont riches en groupes hydroxyle phénoliques ayant des effets antioxydants en impliquant trois processus: le piégeage des radicaux libres, l'inhibition de la génération de radicaux libres et la peroxydation anti-lipidique (Kolac et al., 2017). Les acides phénoliques sont des composés anti-dommages du foie potentiels en protégeant les cellules hépatiques et préservant l'intégrité de la membrane lysosomale. Cette protection du foie peut être obtenue par les mécanismes suivants: élimination des radicaux libres, inhibition de la peroxydation lipidique, inhibition de l'expression des cytokines inflammatoires et amélioration de l'expression de la protéine membranaire 1 associée au lysosome (LAMP1) qui a été considérablement réduite par l'attaque de H₂O₂ (Yuan et al., 2015 ; Wang et al., 2019).

Certains acides phénoliques ont un effet protecteur contre des affections telles que l'ischémie de re-perfusion par ischémie myocardique en régulant le métabolisme de l'oxygène actif, en réduisant le stress oxydatif et l'apoptose du myocarde et par conséquent l'amélioration des changements ultra-structuraux du myocarde (Xue et al., 2014).

In addition, data of this study confirmed that vitamin E plays a significant role in the evolution of acute liver toxicity and PCP-induced oxidative damage in rats. Vitamin E has the ability to inhibit lipid peroxidation, hepatocellular degeneration, necrosis, DNA damage, and extracellular matrix damage (Timbrell et al., 1995, Zhou et al., 1996; al., 2013).

Our extracts have shown *in vivo* that they can act as terminators of radical chains that convert reactive free radicals into stable and nonreactive products, as well as as chemoprotective agents against oxidative damage induced at the level of different cells after ingestion of PCP.

In our *in vivo* study, we reconfirmed the results of the *in vitro* experimental study; who pointed out that these extracts have an important antioxidant potential offered by their high design of polyphenolic and flavonoid content, revealed by the free radical scavenging capacity, the power of inhibition of lipid peroxidation and the power to protect DNA against oxidative damage. In addition, these results confirmed the ratio of anticancer activity that argues that the extracts studied can prevent the spread of HeLa (human carcinoma of the human cervix) and C6 (rat brain tumor) cell lines at high concentrations with no cytotoxic effect detected.

Further studies are needed to better understand the possible mechanisms of action of these plant extracts with respect to PCP-induced toxicity.

General conclusion

Examination of several parts of phenolic plants resembling fruits, vegetables, nuts, seeds, leaves, roots and bark has recognized their powerful pharmacological actions and healing possessions. On this basis, we are witnessing a revival of herbal medicine. The determination of the antioxidant capacity of biological extracts requires certain analytical approaches.

In the present study, the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *P. coronopifolia* (EtOAc-PC and *n*-BuOH-PC) and the metanol extract of *G. reboudiana* plant (MeOH-GR) show a richness in phenolic compounds and particularly flavonoids. These compounds provided a very important antioxidant power compared to antioxidant standards. This power is justified *in vitro* by the reducing power and the large scavenging capacity of ROS, metal chelation as well as inhibition of lipid peroxidation.

Indeed, the important polyphenol design protected the plasmid DNA against the oxidative damage induced by ROS. Thus, an effective antiproliferative activity of higher concentration has been proven in our various extracts, and especially in the examined extracts of *P. coronopifolia* against the C6 and HeLa cancer cell lines.

In addition, several *in vivo* methods complimenting antioxidant potency have been performed. These methods have proven that our extracts have a very important protective effect acts on the maintenance of the antioxidant system against xenobiotics. This effect has been demonstrated via *in vivo* animal experimentation by inducing acute intoxication in adult rats by Pentachlorophenol (PCP).

In addition, ingesting of PCP for two weeks (20 mg / kg/ day) caused very significant functional alterations in the liver, kidney and hearts of rats. PCP has caused damage to the electrical system in the cell membranes. This dysfunction is demonstrated by the significant increase in MDA, one of the main products resulting from lipid peroxidation. As well as, examination of biochemical parameters in the serum of these rats recorded an increase in AST and ALT transaminases indicating lipid peroxidation at hepatocyte membranes as an increase in urea and creatin concentrations indicating the alteration of renal function. These changes in lipid profile have similarly proved by the increase of serum cholesterol and triglyceride levels. PCP caused a decrease in antioxidant enzyme activity such as GPx and decreased GSH levels.

On the other hand, the *n*-butanol extracts of *P. coronopifolia* and the metanol extract of *G. reboudiana* plant have shown that they can act as radical chain terminators that converts reactive free radicals into stable, non-reactive products, and also as chemo-protectants against the oxidative damage induced in liver, kidney and heart cells after ingesting PCP. Co-treatment of the rats with our extracts shows that they are able to normalize the MDA level, reduced glutathion and GPx activity in homogenates. They are also capable to decrease the activities of AST and ALT transaminases, as well as the cholesterol, triglyceride, urea and creatine concentrations in the serum of rats poisoned by PCP.

Following our *in vitro* and *in vivo* studies which show the importance of the antioxidant effect of our extracts, the histological study showed the hepatoprotective, nephro-protective and cardio-protective effect of our extracts against PCP-induced acute intoxications, protecting the liver, kidney and heart architectures and decreasing their functional and structural alterations.

Our extracts have shown a protective effect against lipid, electrical and oxidative imbalance; as well as a hepatoprotective, nephro-protective and cardio-protective effect against acute toxicity induced by PCP in Wistar Albino rats.



Références bibliographiques

Abhay K P, Sunanda D. (2015). Histological changes in liver and kidney of cat fish, *Heteropneustes fossilis*, exposed to pentachlorophenol (PCP). *Plant Archives*, 15 (2): 1117-1120.

Agarra J-P. (2017). L'objectif Physionutrition : Détoxifier, pourquoi ? Comment? La lettre de l'institut Thérascience. <https://www.jeanpierre-agarra.com>, Publié le : 02.11.2017. Consulté: le 25.05.2018.

Agha EF, S Hassannane M, Omara E, M Hasan A, El-Toumy S. (2013). Protective Effect of *Punica granatum* Peel Extract Against Pentachlorophenol-Induced Oxidative Stress, Cytogenetic Toxicity and Hepatic Damage in Rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 7. 853-864.

Agina G, Amar Z, Muhammed A, Nouredine G, Ibrahim D, Ayse SY, Labib N, Mesbah L. (2018). Phenolic Content, Anti-Proliferative and Antioxidant Activities of Butanolic Extract of *Euphorbia Helioscopia L.* Growing in Humid Area in Algeria. *World J Environ Biosci*, 7 (1): 64-69.

Akroume S. (2006). Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba L. 701*. *Aceites*, 61: 86-94.

Ali Demirci M, Ipek Yaşar, Gül F, Özen T, Demirtas I. (2018). Extraction, isolation of heat-resistance phenolic compounds, antioxidant properties, characterization and purification of 5-hydroxymaltol from Turkish Apple pulps. *Food Chemistry*. 269.

Aliouche L, Habiba Larguet H, Amel Amrani A, Francisco León F, Ignacio Brouard I, Samir Benayache S, Djamila Zama D, Zahia Meraihi Z, Benayache F. (2018). Isolation, antioxidant and antimicrobial activities of ecdysteroids from *Serratula cichoracea*. *Current Bioactive Compounds*, 14 (1): 60 – 66.

Amara A. (2012). Évaluation de la toxicité de pesticides sur quatre niveaux trophiques marins : microalgues, échinoderme, bivalves et poisson. Thèse de Doctorat. Sciences Agricoles. Université de Bretagne Occidentale - Brest, France. 212 p.

Amiot MJ, Riollot C, Landrier JF. (2009). Polyphénols et syndrome métabolique. *Médecine des maladies Métaboliques*, 3 (5) : 476-482.

Amrani A, Benaissa O, Boubekri N, Zama D, Benayache F, Benayache S. (2017a). *In vitro* antioxidant activities of *Rhanterium suaveolens* extracts. *JMES*, 8 (11): 4002-4006.

- Amrani A, Benaissa O, Boubekri N, Zama D, Benayache F, Benayache S. (2014).** Effet hépatoprotecteur et antiradicalaire d'un extrait butanolique de *Rhanterium suaveolens*. *Phytothérapie*, 12:386-392.
- Amrani A, Boubekri N, Lassed S, Zama D, Benayache F, Benayache S. (2017b).** Alcohol induced hepatocardiotoxicity and oxidative damage in rats: The protective effect of *n*-butanol extract of green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze *Cardiovascular & Hematological Disorders - Drug Targets*, 17 (1): 18-23.
- Angela JU, Ambali S, Ayo J, Mohammed B and Uchendu C. (2012).** Alleviating effects of melatonin on oxidative changes in the testes and pituitary glands evoked by subacute chlorpyrifos administration in Wistar rats. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2 (8): 645-650.
- Angela JU, Ambali S, Ayo J, Mohammed B, Uchendu C. (2012).** Alleviating effects of melatonin on oxidative changes in the testes and pituitary glands evoked by subacute chlorpyrifos administration in Wistar rats. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2: 645-50.
- Apak R, Ozyurek M, Guclu K, & Capanoglu E. (2016).** Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (5): 997–1027.
- Arora N, Tripathi D, Pandey N, Rai KK, Rai SK, Pandey-Rai S. (2017).** Study of Antioxidant, Anti-inflammatory, and DNA-Damage Protection Properties of Some Indian Medicinal Plants Reveal their Possible Role in Combating Psoriasis. *Int J Appl Sci Biotechnol*, 5: 141-149.
- ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2001).** Toxicological profile for pentachlorophenol. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, 316 p.
- Azzouzi D. (2017).** Investigation phytochimique et recherche d'activité biologique de deux espèces du genre *Centaurea* (Asteraceae). Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences Exactes. Université Frères Mentouri Constantine 1. 251 p.
- Bacon SR. (2014).** Oxydation chimique du pentachlorophénol par le persulfate de sodium activé par la chaleur. Thèse de Doctorat. Ecole de Technologie Supérieure, Montréal. 99 p.
- Bang SH, Hyun YJ, Shim J, Hong SW, Kim DH. (2014).** Metabolism of rutin and poncirin by human intestinal microbiota and cloning of their metabolizing α -L-rhamnosidase from

Bifidobacterium dentium. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25 (1). 10.4014/jmb.1404.04060.

Barros L, Baptista P, Ferreira IC. (2007). Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food Chem Toxicol*, 45: 1731-1737.

Batra P, Sharma AK. (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *Biotech*, 3 (6): 439–459.

Beard AP, Bartlewski PM, Chandolia RK. (1999a). Reproductive and endocrine function in rams exposed to the organochlorine pesticides lindane and pentachlorophenol. *J Reprod Fertil*, 115: 303-314.

Beard AP, Bartlewski PM, Rawlings NC. (1999b). Endocrine and reproductive function in ewes exposed to the organochlorine pesticides lindane or pentachlorophenol. *J Toxicol Environ Health*, 56:23-46.

Beard AP, Rawlings NC. (1999). Thyroid function and effects of reproduction in ewes exposed to the organochlorine pesticides lindane or pentachlorophenol (PCP) from conception. *J Toxicol Environ Health*, 58:509-530.

Bebe FN, Panemangalore M. (2003). Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats. *J. Environ. Sci. Health*, B 38: 349–363.

Bekhouche K, Ozen T, Boussaha S, Koldan K, Yenigun S, Lassed S, Demirtas I, Benayache F, Benayache S, Zama D. (2018). Anti-oxidant, DNA-damage protection and anti-cancer properties of *n*-butanol extract of the endemic *Perralderia coronopifolia*. *Bangladesh J Pharmacol*, 13: 82-89.

Ben-Simhon Z, Judeinstein S, Trainin T, Harel BR, Bar-Ya'akov I, Borochoy-Neori H, Holland D. (2015). A "White" Anthocyanin-less Pomegranate (*Punica granatum L.*) Caused by an Insertion in the Coding Region of the Leucoanthocyanidin Dioxygenase (LDOX; ANS) *Gene*. *PloS one*, 10: 0142777.

Besser JM, Dorman RA, Hardesty DL, Ingersoll CG. (2016). Survival and growth of freshwater pulmonate and nonpulmonate snails in 28-day exposures to copper, ammonia, and pentachlorophenol. *Arch. Environ. Con. Toxicol*, 70: 321-331.

- Boaventura B C B, Di Pietro P F, Klein G A, Stefanuto A, de Morais E C, de Andrade F, Wazlawik E, Da Silva E L. (2013).** Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and prediabetic individuals. *J Func Foods*, 5: 1057– 1064.
- Bouabdelli F, Djelloul A, Kaid-Omar Z, Semmoud A, Addou A. (2012).** Antimicrobial activity of 22 plants used in urolithiasis medicine in western Algeria. *Asian Pac J Trop Disease*, 2: 530-535.
- Boubekri N, Boukaabache R, Amrani A, Belfarhi L, Zama D, Boumaza O, benayache F, Benayache S. (2014).** Hepatoprotective effect of *Genista quadriflora munby* extract against ethanol induced toxicity. *Asian J Pharm Clin Res*, 17(Suppl 1): 226-229.
- Boumaza O. (2012).** Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de *Genista tricuspidata* (Fabaceae), et *Haloxylon scoparium* (Chenopodiaceae). Faculte des Sciences Exactes, Université Frères Mentouri Constantine 1, Algérie. 219 p.
- Boussaha S, Bekhouche K, Boudjerda A, León F, Koldaş S, Yaglioglu AS, Demirtaş I, Brouard I, Marchioni E, Zama D, Benayache S, Benayache F. (2015).** Chemical constituents, *in vitro* antioxidant and antiproliferative activities of *Perralderia coronopifolia* Coss. subsp. *eu-coronopifolia* M. var. *typica* M. extract. *Rec. Nat. Prod*, 9 (3) : 312- 322.
- Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I. (2001).** Antioxidant principles from baubinia t arapotensis. *J Nat. Prod*, 64: 892-895.
- Braca A, DeTommasi N, DiBari L, Pizza C, Politi M, Morelli I. (2001).** Antioxidant principles from baubinia t arapotensis. *J Nat. Prod*, 64: 892-895.
- Brand W, Cuvelier ME, Berset C. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol*, 28: 25-30.
- Braun WH, Blau GE, Chenoweth MB. (1979).** The metabolism/pharmacokinetics of pentachlorophenol in man, and a comparison with the rat and monkey. In: Deichmann WE, ed. Toxicology and occupational medicine. *New York, NY: Elsevier*, 289-296.
- Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. (2013).** Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24 (8): 1415–1422.
- CCME : Conseil canadien des ministres de l'environnement. (1999).** Recommandations canadiennes pour la qualité des sols : Environnement et santé humaine -Pentachlorophénol. *Winnipeg, Canada*, 7 p.

Références bibliographiques

CE : Commission Européenne. (1993). Directive 93/72/CEE de la Commission du 1er septembre 1993 portant dix-neuvième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses. Journal officiel n° L 258 du 16/10/1993 p. 0029 – 0030.

CEC: Commission for Environmental Cooperation of North America. (2002). Making the environment Healthier for Our Kids-An overview of environmental challenges to the health of North America's children. Rapport, 10p.

Chaudhary AK, Nokubo M, Reddy GR, Yeola SN, Morrow JD, Blair IA, Marnett LJ. (1994). Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science-New York Then Washington*, 1580-1580.

Chen J, Jiang J, Zhang F, Yu H, Zhang J, (2004). Cytotoxic effects of environmentally relevant chlorophenols on L929 cells and their mechanisms. *Cell Biol. Toxicol*, 20: 183–196.

Chhabra RS, Maronpot RM, Bucher JR. (1999). Toxicology and carcinogenesis studies of pentachlorophenol in rats. *Toxicol Sci*, 48:14-20.

Constanze P, Juliane H, Falk D, Patricia BH. (2014). Les effets cytotoxiques du pentachlorophénol (PCP) et son métabolite tétrachlorohydroquinone (TCHQ) sur les cellules du foie sont modulées par des antioxydants. *Biologie cellulaire et toxicologie*, 30 (4) : 233-252.

CPP : Comité de la prévention et de la précaution. (2002). Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. Ministère de l'écologie et du développement durable. Rapport, 47 p.

Cragg GM, Newman DJ. (2005). Plants as a source of anticancer agents. *J Ethnopharmacol*, 100 (12): 72-9.

Croft KD. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854: 435-442.

Daniel R, Bruno M, Maria del MG-B et Frédéric B. (2002). Uncoupling protein, superoxide ion and mitochondrial respiration. *Med Sci (Paris)*, 18: 537–539.

Daroui MH. (2012). Etude phytochimique et biologique des espèces *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniolum olusatrum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum*

trifurcatum (Asteraceae). Faculté de Sciences, Université de Badji Mokhtar-Annaba. Algérie, 198 p.

Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett*, 468(2-3):166-70.

Degletagne C. (2011). Penguin acclimatization to polar environmental constraints: a transcriptomic and integrative study in King (*Aptenodytes patagonicus*) and Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*). Agricultural Sciences. Claude Bernard Lyon I University, French. p 238.

Demirtas I, Sahin A, Ayhan B, Tekin S, Telci I. (2009). Antiproliferative effects of the methanolic extracts of *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis*. *Rec Nat. Prod*, 3: 104-109.

Demirtas I, Sahin A. (2013). Bioactive volatile content of the stem and root of *Centaurea carduiformis* DC. subsp. *carduiformis* var. *carduiformis*, *E-J Chem* doi: 10.1155/2013/125286.

Deprez S, Mila I, Huneau J-F, Tome D, Scalbert A. (2001). Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxidants and Redox Signaling*, 3 (6): 957–967.

Dinis TC, Madeira VM, Almeida LM. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*, 315: 161-169.

Djebbari R, Chemam Y, Boubekri N, Lakroun Z, Kebieche M, Amrani A, Benayache F, Benayache S, Zama D. (2017). Chemoprotective Potential of *Helianthemum confertum* Against the Loss of Molecular and Functional Integrity of the Liver Cell in Doxorubicin-Treated Rats. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 9. 903-910.

Dong YL, Zhou PJ, Jiang SY, Pan XW, Zhao XH. (2009). Induction of oxidative stress and apoptosis by pentachlorophenol in primary cultures of Carassius hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol,C*, 150: 179-185.

Dorsey WC, Tchounwou PB, Ford BD. (2006). Neuregulin 1-Beta cytoprotective role in AML 12 mouse hepatocytes exposed to pentachlorophenol. *Int J Environ Res Public Health*, 3: 11–22.

Références bibliographiques

- Du ZH, Qin L, Lin J, Sun YC, Xia J, Zhang C, Li XN, Li JL. (2017).** Activating nuclear xenobiotic receptors and triggering ER stress and hepatic cytochromes P450 systems in quails (*Coturnix C. coturnix*) during atrazine exposure. *Environ. Toxicol*, 32 (6): 1813-1822.
- Dubois M, Grosse Y, Thome JP, Kremers P, PfohlLeszkowicz A. (1997).** Metabolic activation and DNA-adducts detection as biomarkers of chlorinated pesticide exposures. *Biomarkers*, 2: 17-24.
- EL MRABET K. (2008).** Développement d'une méthode d'analyse de résidus de pesticides par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem dans les matrices céréalières après extraction en solvant chaud. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie, Spécialité Chimie Analytique. 292 p.
- Ellman G. L. (1959).** Plasma antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys*, 82: 70- 77.
- Encarnacion AB, Fagutao F, Jintasataporn O, Worawattanamateekul W, Hirono I, Ohshima T. (2012).** Application of ergothioneine-rich extract from an edible mushroom *Flammulina velutipes* for melanosis prevention in shrimp, *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. *Food Res. Int*, 45: 232–237.
- EPA: Environmental Protection Agency. (2012).** Technical factsheet on: Pentachlorophenol. Washington D.C. United States, 4 p.
- Erk T, Hauser J, Williamson G. (2014).** Structure- and dose-absorption relationships of coffee polyphenols. *BioFactors*. 40 (1): 103–112.
- Fang Q, Shi X, Zhang L, Wang Q, Wang X, Guo Y, Zhou B. (2015).** Effect of titanium dioxide nanoparticles on the bioavailability, metabolism, and toxicity of pentachlorophenol in zebrafish larvae. *J. Hazard. Mater*, 283: 897-904.
- Fernández FP, Labrador V, Pérez MJM, Hazen MJ. (2005).** Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol. *Toxicology*, 210: 37-44.
- Fernández, FP, Labrador V, Pérez MJM, Hazen MJ. (2005).** Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol. *Toxicology*, 210: 37-44.
- Fisher B. (1991).** Pentachlorophenol: toxicology and environmental fate. *J. Pesticide Reform*, 11(1): 1-5.
- Fleischer M, Meiss R, Robenek H. (1980).** Ultrastructural morphometric investigations on rat liver of young and adult rats after treatment with technical pentachlorophenol (PCP). *Arch Toxicol*, 44: 243-257.

Références bibliographiques

- Flohe L, Gunzler W.A. (1984).** Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymo*, 105:114–121.
- Flora SJ, Mittal M, Mehta A. (2008).** Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 128 (4): 501-23.
- Gao JJ, Liu LH, Liu XR, Zhou HD, Huang SB, Wang ZJ. (2008).** Levels and spatial distribution of chlorophenols 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, and pentachlorophenol in surface water of China. *Chemosphere*, 71: 1181–1187.
- Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H. (1999).** Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochem. Biophys. Acta*, 1472: 643-650.
- Gasiewicz TA. (1991).** Nitro compounds and related phenolic pesticides. In: Hayes WJ, Lawes ER (eds) *Handbook of pesticides toxicology*, Academic, San Diego, 3: 1191–1269.
- Gebel TW. (2002).** Arsenic methylation is a process of detoxification through accelerated excretion, *Int J Hyg Environ Health*, 205 (6): 505-8.
- Greichus YA, Libal GW, Johnson DD. (1979).** Diagnosis and physiologic effects of pentachlorophenols on young pigs: Part I. Effects of purified pentachlorophenol. *Bull Environ Contam Toxicol*, 23: 418-422.
- Guha G, Rajkumar V, Ashok Kumar R, Mathew L. (2011).** Therapeutic potential of polar and non-polar extracts of *Cyanthillium cinereum* in vitro. *Evid-Based Compl Alt*, 1-10.
- Hamdouch A, Ali A, Chebli B, Idrissi Hassani LM. (2017).** Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oils of *Perralderia coronopifolia* Cosson subsp. *Purpurascens* shrub of Oasis of Tata from south east of Morocco. *Applied Journal of Environmental Engineering Science*, 3-4.
- Han ZX, JH Wang, WA Zhou. (2009).** Battery of tests for ecotoxicological evaluation of Pentachlorophenol on common Carp. *Int J of Green Nanotech-nology: Biomedicine*, 1: B97-B107.
- Hany K. (2017).** Phytochemistry and biological activities of selected Lebanese plant species (*Crataegus azarolus* L. and *Ephedra campylopoda*). *Human Health and Pathology*. Université de Limoges. 98 p.

- He R, Wang LP, Zhu JL, Fei MM, Bao SH, Meng Y, Wang YY, Li JB, Deng XM. (2016).** Methane-rich saline protects against concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice through anti-inflammatory and anti-oxidative pathways. *Biochem. Bioph. Res. Co*, 470: 22-28.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. (2002).** Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13b (10):b572-584.
- Hurd T, Walker J, Whalen MM. (2012).** Pentachlorophenol decreases tumor-cell-binding capacity and cell-surface protein expression of human natural killer cells. *J. Appl. Toxicol*, 32 (8): 627–634.
- Hurtado-Fernandez E, Romero MG, Pancorbo AC. (2010).** Application and potentiel of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53: 1130-1160.
- IARC. (1991).** Occupational exposures in insecticide application and some pesticides, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 53.
- INRS: Institut national de recherche et de sécurité. (2013).** Pentachlorophénol et sels de sodium et de potassium. Base de données : Fiche toxicologique n°11, 9 p.
- Iwashina T. (2015).** Contribution of flower colors of flavonoids including anthocyanins: a review. *Nat. Prod. Commun.* 10: 529–544.
- Jadwiga P, Strucinski P, Mikolajczyk S, Maszewski S, Rachubik J, Pajurek M. (2016).** Pentachlorophenol from an old henhouse as a dioxin source in eggs and related human exposure. *Environ Pollut*, 208: 404–412.
- Jaszek M, Osinska-Jaroszuk M, Janusz G, Matuszewska A, Stefaniuk D, Sulej J, Polak, J, Ruminowicz M, Grzywnowicz K, Jarosz-Wilkolazka A. (2013).** New bioactive fungal molecules with high antioxidant and antimicrobial capacity isolated from *Cerrena unicolor* idiophasic cultures. *Biomed. Res. Int*, 497492: 11 p.
- Jaume F, Marc YV, Daniel A, Aureli VT, Meritxell B, Marta L, Francesc XS, Victor R, Antoni C, Merce P. (2009).** Evaluation of pathways involved in pentachlorophenol-induced apoptosis in rat neurons. *NeuroToxicology*, 30 : 451–458.
- Jawich D. (2005).** Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux genres de levures : approche cinétique et moléculaire. Thèse de doctorat. L'Institut National Polytechnique de Toulouse. And Université Saint Joseph de Beyrouth. 134 p.

- Jeyaprakash K, Ayyanar M, Geetha KN, Sekar T. (2011).** Tradional uses of medicinal plants among the tribal people in Theni District (Western Ghats), Southern India. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1 (1), supplement: S20-S25.
- Jhonson I. (1999).** Antioxydants et anticancéreux. *Biofutur*, 186: 14-15.
- Jomova K, Valko M. (2011).** Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283 (2-3): 65-87.
- Juc L. (2007).** Etude des risques lies a l'utilisation des pesticides organochlorés et impact sur l'environnement et la santé humaine. Sciences de la Terre, Université Claude Bernard - Lyon I, France. 228 p.
- Kada S, Bouriche H, Senator A, Demirtaş I, Özen T, Toptanci BÇ , Kızıl G, Kızıl M. (2017).** Protective activity of *Hertia cheirifolia* extracts against DNA damage, lipid peroxidation and protein oxidation. *Pharmaceutical Biology*, 55 (1): 330-337.
- Kan HF, Zhao FZ, Zhang XX, Ren HQ, Gao SX. (2015).** Correlations of gut microbial community shift with hepatic damage and growth inhibition of *Carassius auratus* induced by pentachlorophenol exposure. *Environ. Sci. Technol* 49, 11894-11902.
- Kang YJ and Zhou Z. (2005).** Zinc prevention and treatment of alcoholic liver disease. *Mol Aspects Med.* 26 (4-5): 391-404.
- Karami-Mohajeri S, Abdollahi M. (2010).** Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A systematic review. *Human & Experimental Toxicology*, 30 (9): 1119-1140.
- Karlsson L, Cragin L, Center G, Giguere C, Comstock J, Boccuzzo L, Sumner A. (2013).** Pentachlorophenol contamination of private drinking water from treated utility poles. *Am. J. Public. Health*, 103: 276-277.
- Khaled A, Virpi L, Petri R, Jenni K, Paavo H, Sampo M, Olavi P, Jukka H. (2012).** Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. *Toxicology*, 294 : 17–26.
- Kidd PS, Llugany M, Poschenrieder C, Gunse B, and Barcelo J. (2001).** The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays L.*). *J. Exp. Bot*, 52: 1339–1352.
- Kim J, Copley SD. (2012).** Inhibitory cross-talk upon introduction of a new metabolic pathway into an existing metabolic network. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: E2856–E2864.

- Klemmer HW, Wong L, Sato MM, et al. (1980).** Clinical findings in workers exposed to pentachlorophenol. *Arch Environ Contam Toxicol*, 9: 715-725.
- Kolac UK, Ustuner MC, Tekin N, Ustuner D, Colak E, Entok E. (2017).** The Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of *Salvia officinalis* on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Rats. *J. Med. Food*, 20: 1193–1200.
- Koldaş S, Demirtas I, Ozen T, Demirci MA, Behçet L. (2015).** Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare L. ssp. viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. *J Sci Food Agr*, 95: 786-798.
- Kumar KH, Razack S, Nallamuthu I, Khanum F. (2014).** Phytochemical analysis and biological properties of *Cyperus rotundus L.* *Ind. Crop. Prod.*, 52: 815– 826.
- Kumar PS, Sucheta S, Deepa VS, Selvamani P, Latha S. (2008).** Antioxidant activity in some selected Indian medicinal plants. *Afr J Biotechnol*, 7: 1826-1828.
- Lahneche AM, Boucheham R, Boubekri N, Bensaci S, Bicha S, Bentamenne A, Benayache F, Benayache S, Zama D. (2017).** Sodium valproate-induced hepatic dysfunction in Albino rats and protective role of *n*-Butanol extract of *Centaurea sphaerocephala L.* *Int J of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9 (10): 1335-1343.
- Landete JM. (2011).** Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44 (5): 1150–1160.
- Lassed S, Amrani A, Altun M, Zama D, Demirtas I, Benayache F, Benayache S. (2015).** *In vitro* antioxidant, inhibition of oxidative DNA damage and antiproliferative activities of ethanolic green tea (*Camellia sinensis*) extract. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 35: 36-42.
- Laura M, Elisa M M, Claudio J V, Felipe L. (2015).** Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *Biomed Res Int*, 905215. doi: 10.1155/2015/905215.
- Lavoie Marie-Eve. (2012).** Inflammation, stress oxydant, profil métabolique : influence des apports alimentaires et de la dépense énergétique. Thèse de Doctorat. Département de Nutrition, Faculté de Médecine. Université de Montréal. 326p.
- Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*, 30: 1076-1081.
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N. (2006).** Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 405-430.

- Lin, P-H, La D, Upton P, Swenberg J. (2002).** Analysis of DNA adducts in rats exposed to pentachlorophenol. *Carcinogenesis*, 23: 365-9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193:265-275.
- Lushchak VI. (2011).** Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153: 175-190.
- Lushchak, V.I. (2011)** Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153: 175-190.
- Maatooq GT. (2002).** Zeitschrift fur Naturforschung C. *Journal of Biosciences*, pp 654659.
- Maja K, Anita K, Dragica J, Nina T, Jovana V, Predrag P, Miomir N, Miroslav MV, Leo VG. 2015.** Antioxidants of Edible Mushrooms. *Molecules*, 20 (10): 19489-19525.
- Maria LFF, Sebastián R, Paula C. (2012).** Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3: 222.
- Martin S et Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angiologie*, 51: 304-315.
- McConnell EE, Moore JA, Gupta BN. (1980).** The chronic toxicity of technical and analytical pentachlorophenol in cattle. I - Clinicopathology. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 52: 468-490.
- McDonough KH. (2003).** Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicology*, 189: 89-97.
- Mechri A, Benabderrahmane W, Amrani A, Boubekri N, Benayache F, Benayache S, Zama D. (2019).** Hepatoprotective effects of Algerian *Crataegus oxyacantha* leaves. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 10 (6): 70-75.
- Mehta A, Verma RS, Srivastava N. (2009).** Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver. *Pestic. Biochem. Phys*, 94: 55-59.
- Mieczyslaw B. (2008).** Risk profile of pentachlorophenol. Dossier prepared in support of a proposal of pentachlorophenol to be considered as a candidate for inclusion in the Annex I to the Protocol to the 1979 Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution on Persistent Organic Pollutants (LRTAP Protocol on POPs). Warsaw, Poland. 87p.
- Moein S. (2015).** Polyphenols and cancer: A review. *Molecular Medicine Journal*, 1 (1): 6-12.

- Montano M, Gutleb AC, Murk AJ. (2013).** Persistent toxic burdens of halogenated phenolic compounds in humans and wildlife. *Environ. Sci. Technol*, 47: 6071-6081.
- Morgan M, Jones P, Sobus J. (2015).** Short-term variability and predictors of urinary pentachlorophenol levels in Ohio preschool children. *Int J Environ Res Public Health*, 12: 800–815.
- Mukhopadhyay P, Vogel HJ, Tieleman DP. (2004).** Distribution of pentachlorophenol in phospholipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J*, 86: 337–345.
- Mulvihill EE, Burke AC, Huff MW. (2016).** Citrus flavonoids as regulators of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, 36: 275-299.
- Nakagawa K, Okuda S, Miyazawa T. (1997).** Dose-dependent incorporation of tea catechins, epigallocatechin-3-gallate and epigallocatechin, into human plasma. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61 (12): 1981–1985.
- Nakayama T. (1994).** Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Res*, 54: 1991-1993.
- Nasir A, Abubakar MG, Shehu RA, Aliyu U, Toge BK. (2013).** Hepatoprotective effect of the aqueous leaf extract of *Andrographis paniculata* Nees against carbon tetrachloride – induced hepatotoxicity in rats. *Nig J Basic Appl Sci*, 21 (1): 45-54.
- Nishimura H, Nishimura N, Oshima H. (1980).** Experimental studies on the toxicity of pentachlorophenol. *J Aichi Med Univ Assoc*, 8: 203-209.
- Obodai M, Ferreira ICFR, Fernandes A, Barros L, Narh Mensah DL, Dzomeku M, Urban AF, Prempeh J, Takli RK. (2014).** Evaluation of the chemical and antioxidant properties of wild and cultivated mushrooms of Ghana. *Molecules*, 19: 19532–19548.
- Ogata M, Hoshi M, Urano S, Endo T. (2000).** Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem. Pharm. Bull*, 48 (10): 1467-1469.
- Ozen T, Darcan C, Aktop O, Turkecul I. (2011).** Screening of antioxidant, antimicrobial activities and chemical contents of edible mushrooms wildy grown in the Black Sea region of Turkey. *Comb Chem High T Scr*, 14: 72-84.
- Ozen T, Yenigun S, Altun M, Demirtas I. (2017a).** Phytochemical constituents, ChEs and urease inhibition, antiproliferative and antioxidant properties of *Elaeagnus umbellata* Thunb. *Comb Chem High Throughput Screen*, 20 (6): 559-578.

- Ozen T, Yenigun S, Altun M, Demirtas I. (2017a).** Phytochemical constituents, ChEs and urease inhibition, antiproliferative and antioxidant properties of *Elaeagnus umbellata Thunb.* *Comb Chem High Throughput Screen*, 20 (6): 559-578.
- Ozen T, Yildirim K, Toka M . (2017b).** The impacts of *Elaeagnus umbellata Thunb.* leaf and fruit aqueous extracts on mice hepatic, extrahepatic antioxidant and drug metabolizing enzymes related structures. *Braz. J. Pharm. Sci*, 53 (3): E17095.
- Özen T. (2010).** Antioxidant activity of wild edible plants in the Black Sea Region of Turkey. *Grasas Aceites*, 61: 86-94.
- Pastoriza S, Rufian-Henares JA, Delgado-Andrade C. (2015).** Effects of long-term consumption of standard diets including glucose-lysine model glycated compounds on the antioxidant status of adult rats. *Food Chem*. 183: 283–290.
- Paul DR, Bo-Wen H, Yoshiaki T. (2012).** Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24 (5): 981-990.
- Pekari K, Luotamo M, Jarvisalo J, Lindroos L, Aitoi A. (1991).** Urinary excretion of chlorinated phenols in saw-mill workers. *Int Arch. Occ. Env. Health*, 63: 57–62.
- Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. (2008).** Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch. Toxicol*, 82: 667-715.
- Peng J, Jianshe W, Jinguo Z, Jiayin D. (2016).** Effects of pentachlorophenol on the detoxification system in white-rumped munia (*Lonchura striata*). *J. Environ. Sci.-China*, 44: 224-234.
- Peng J, Jianshe W, Nan S, Dongbing W, Jiayin D. (2017).** Effects of pentachlorophenol on the quail (*Coturnix japonica*) liver detoxification pathway. *Chemosphere*, 177: 44-50.
- Pereira NX, Souza SF, Roberto GJ , Tolentino LJ, Augusto ARL, José Quintans JL, Barbosa FM. (2012).** Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. Chapter1. In “phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health”. 1ère édition Venketeshwer Rao. P 1-20. Available in :<http://www.intechopen.com/books>.
- Pico Y, Font G, Ruiz MJ, Fernandez M. (2006).** Control of pesticide residues by liquid chromatography-mass spectrometry to ensure food safety. *Mass Spectrom. Rev*, 25 (6): 917–960.

Références bibliographiques

- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, 269: 337-341.
- Raha S, Robinson BH. (2000).** Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *TIBS*, 25: 502-508.
- Rai DK, Sharma B. (2007).** Carbofuran-induced oxidative stress in mammalian brain, *Mol. Biotechnol*, 37: 66–71.
- Rawani A, Pal S, Chandra G. (2011).** Evaluation of antimicrobial properties of four plants extracts against human pathogens. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1 (1): supplement, S71-S75.
- Rawlings NC, Cook SJ, Waldbillig D. (1998).** Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2,4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. *J Toxicol Environ Health, Part A*, 54:21-36.
- Rifai A. (2013).** Etude de la dégradation par photolyse directe de pesticides - Caractérisation structurale et toxicité potentielle des photoproduits. Thèse de Doctorat. Chimie Analytique. Ecole Polytechnique X, France. 236 p.
- Robert B. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences*, 22: 266-72.
- Rugman FP, Cosstick R. (1990).** Aplastic anemia associated with organochlorine pesticide: Case reports and review of evidence. *J Clin Pathol*, 43:98-101.
- Russo A, Izzo A, Cardile V, Borrelli F, Vanella A. (2001).** Indian medicinal plants as antiradicals and DNA cleavage protectors. *Phytomedicine*, 8: 125-132.
- Sai-Kato K, Umemura T, Takagi A, Hasegawa R, Tanimura A, Kurokawa Y. (1995).** Pentachlorophenol-induced oxidative DNA damage in mouse liver and protective effect of antioxidants. *Food Chem. Toxicol*, 33: 877-882.
- Sak K. (2014).** Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev*, 8 (16): 122–146.
- Scalbert A. (2001).** Polyphénols du thé : Sources alimentaires, consommation et biodisponibilité. *Biofutur*, 186 p.
- Schwartz JL, Baker V, Larios E, Chung FL (2005).** Molecular and cellular effects of green tea on oral cells of smokers: a pilot study, *Mol Nutr Food Res*, 49 (1): 43-51.

- Sedighi M, Bahmani M, Asgary S, Beyranvand F, Rafieian-Kopaei M. (2017).** Volatile components of *Centaurea calcitrapa L.* and *Centaurea sphaerocephala L. ssp. sphaerocephala*, two Asteraceae growing wild in Sicily. *Flavour Fragr. J*, 21 (2): 282-285.
- Selma MV, Espín JC, Tomás-Barberán FA. (2009).** Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (15): 6485–6501.
- Servais S. (2004).** Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l’ozone : effets de l’âge et d’une supplémentation en OMEGA-3. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard. Lyon1. 150 p.
- Shan G, Ye M, Zhu B, Zhu L. (2013).** Enhanced cytotoxicity of pentachlorophenol by perfluorooctane sulfonate or perfluorooctanoic acid in HepG2. *cells Chemosphere*, 93: 2101–2107.
- Sies H. (1991).** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*. 91(3): 31-38.
- Singh A, Singh V. (2014). Assessment of serum lipids and proteins of pesticide sprayer farmers after occupational exposure of pesticides in agricultural field. *Ind J Biol Stud Res*, 3 (2): 91-96.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymol*, 299: 152-178.
- Smith JE, Loveless LE, Belden EA. (1996).** Pentachlorophenol poisoning in newborn infants- St. Louis, Missouri. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 45: 545-548.
- Soares JR, Dinis TCP, Cunha AP, Almeida LM. (1997).** Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free rad. Res*, 26: 469-478.
- Sophie R, Marie-Clotilde AG, Julien M, Bruno M, Anne-Marie CD, Frédéric B, Daniel R. (2004).** The biology of mitochondrial Uncoupling Proteins. *Diabetes*, Section III: Mitochondria, Beta-Cell Function and Type 2 Diabetes, 53 (suppl 1): S130-S135.
- Steeve HT, Pascal R, Guy L. (2013).** Neurotoxicité des pesticides Quel impact sur les maladies neurodégénératives ? *médecine/sciences*, 29 : 273-8.

- Steiert JG, Thorna WJ, Ugurbil K, Crawford RL. (1988).** 31P Nuclear magnetic resonance studies of effects of some chlorophenols on *Escherichia coli* and a pentachlorophenol-degrading bacterium. *J. Bacteriol*, 170: 4954-4957.
- Suwalsky M, Espinoza MA, Bagrara M, Sotomayor CP. (1990).** X-ray and fluorescence studies on phospholipid bilayers. IX. Interactions with pentachlorophenol. *Z. Naturforsch*, 45: 265-272.
- Suwanchaichinda C, Brattsten LB. (2001).** Effects of exposure to pesticides on carbaryl toxicity and cytochrome P450 activities in *Aedes albopictus* larvae (Diptera: Culicidae). *Pestic. Biochem. Phys*, 70: 63-73.
- Tang L, Tang M, Xu L, Luo H, Huang T, Yu J, Zhang L, Gao W, Cox SB, Wang JS. (2008).** Modulation of aflatoxin biomarkers in human blood and urine by green tea polyphenols intervention, *Carcinogenesis*, 29 (2): 411-7.
- Timbrell J, Seabra V, Waterfield C. (1995).** The in vivo and in vitro protective properties of taurine. *Gen. Pharmacol.* 26, 453–462.
- Trachootham D, Alexander J, Huang P. (2009).** Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanism: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev*, 8: 579–591.
- Uchiyama M, Mihara M. (1978).** Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem*, 86: 271-278.
- Umemura T, Sai-Kato K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y. (1996).** Oxidative DNA damage and cell proliferation in the livers of B6C3F1 mice exposed to pentachlorophenol in their diet. *Fund. Appl Toxicol*, 30: 285-289.
- Veitch NC, Grayer RJ. (2011).** Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Nat.Prod.Rep*, 28:1626–1695.
- Villena Fred, Montoya G, Klaasen R, Fleckenstein R, Suwalsky Mario. (1992).** Morphological changes on nerves and histopathological effects on liver and kidney of rats by pentachlorophenol (PCP). *Comparative biochemistry and physiology, Comparative pharmacology and toxicology*, 101 (2): 353-363.
- Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. (2007).** Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab*, 9 (6): p. 813-39.

Références bibliographiques

- Wainstock C R, S.Martin V L C. (1980).** Effect chlorophenols on porphyrin metabolism in rats and chick embryo, *int. J. Biochem*, 12: pp 1039-1044.
- Wang H, Gao XD, Zhou GC, Cai L, Yao WB. (2008).** *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chem*, 106: 888-895.
- Wang HC, Brumaghim JL. (2011).** Polyphenol compounds as antioxidants for disease prevention: reactive oxygen species scavenging, Enzyme regulation, and metal chelation mechanisms in *E. coli* and human cells, In *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, Andreescu S; Hepel, M, eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 99-175.
- Wang J, Xu J, Gong X, Yang M, Zhang C, Li M. (2019).** Biosynthesis, Chemistry, and Pharmacology of Polyphenols from Chinese *Salvia* Species: A Review. *Molecules.J*, 24, 155: p 23.
- Wang Y, Ho Y, Jeng J, Su H, Lee C. (2000).** Different cell death mechanisms and gene expression in human cells induced by pentachlorophenol and its major metabolite tetrachlorohydroquinone. *Chem. Biol. Interact*, 128: 173–188.
- Wang Y. (2008).** Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol*, 21: 276281.
- Wang YJ, Ho YS, Chu SW, Lien HG, Liu TH, Lin JK. (1997).** Induction of glutathione depletion, p53 protein accumulation and cellular transformation by tetrachlorohydro-quinone, a toxic metabolite of pentachlorophenol. *Chem Biol Interact*, 105: 1-16.
- Wang YJ, Lee CC, Chang WC, Liou HB, Ho YS. (2001).** Oxidative stress and liver toxicity in rats and human hepatoma cell line induced by pentachlorophenol and its major metabolite tetrachlorohydroquinone. *Toxicology Letters*, 122: 157–169.
- Weigand-Heller J, Kris-Etherton PM, Beelman RB. (2012).** The bioavailability of ergothioneine from mushrooms (*Agaricus bisporus*) and the acute effects on antioxidant capacity and biomarkers of inflammation. *Prev. Med*, 54: S75–S78.
- Wen S, Yali J, Xisheng D, Lili D, Chunsheng L, Jianghua W, Gaofeng Z, Huaidong Z, Liqin Y. (2019).** Combined effects of pentachlorophenol and its byproduct hexachlorobenzene on endocrine and reproduction in zebrafish. *Chemosphere*, 220: 216-226.

- Williams R, Spencer J, Rice-Evans C. (2004).** Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *free radic. Biol. Med*, 36: 838–849.
- Xu T, Zhao J, Xu ZF, Pan RJ, Yin DQ. (2016).** The developmental effects of pentachlorophenol on zebrafish embryos during segmentation: a systematic view. *Scientific Reports*, 6: 25929.
- Xue L, Wu Z, Ji XP, Gao XQ, Guo YH. (2014).** Effect and mechanism of salvianolic acid B on the myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Asian Pac. J. Trop. Med*, 7: 280–284.
- Yaghoğlu AS, Akdulum B, Erenler R, Demirtas I, Telci I, Tekin S. (2013).** Antiproliferative activity of pentadeca-(8E, 13Z) dien-11-yn-2-one and (E)-1, 8-pentadecadiene from *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. roots. *Med Chem Res*, 22: 2946-2953.
- Yang C, Marc E, Hing MC. (2015).** Relative developmental toxicities of pentachloroanisole and pentachlorophenol in a zebrafish model (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112: 7–14
- Yin H, Xu L, Porter NA. (2011).** Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*, 111: 5944–5972.
- Yin H, Xu L, Porter NA. (2011).** Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*, 111: 5944–5972.
- Yoshikawa T, Toyokuni S, Yamamoto Y, Naito Y. 2000.** Free radicals in Chemistry. Biology and Medicine, OICA International, London. CHANGER
- Yu LQ, Zhao GF, Feng M, Wen W, Li K, Zhang PW, Peng X, Huo WJ, Zhou HD. (2014).** Chronic exposure to pentachlorophenol alters thyroid hormones and thyroid hormone pathway mRNAs in zebrafish. *Environ. Toxicol. Chem*, 33 (1): 170–176.
- Yu P L, Shepherd J. (1997).** Pentachlorophenol in New Zealand- Biological treatment option. *Ustralasian Biotechnology*, 7 (6): 340-344.
- Yuan, Y.; Wu, Q.; Shi, J.S.; Chen, X.P. (2015).** Advance in studies on hepatoprotective effect of *Salvia miltiorrhiza* and its main components. *Impurrity Chin. Tradit. Med*, 40: 558–593.
- Zama D, Meraihi Z, Tebibel S, Benayssa W, Benayache F, Benayache S, Vlietinck AJ. (2007).** Chlorpyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: The protective role of the butanolic extract of *Paronychia argentea* L. *Indian J Pharmacol*, 39 (3): 145-150.

- Zhang Z, He Y, Huang Y, Ding L, Chen L, Liu Y. (2018).** Development and optimization of an *in vitro* multienzyme synthetic system for production of kaempferol from naringenin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (31): 8272-8279.
- Zhang Z, He Z, Zhang X. (2019).** Flavonoids and Pectins. *IntechOpen*, 17p.
- Zhao GR, Xiang ZJ, Ye TX, Yuan YJ, Guo ZX. (2006).** Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chem*, 99: 767-774.
- Zheng WW, Wang X, Yu H, Tao XG, Zhou Y, Qu WD. (2011).** Global trends and diversity in pentachlorophenol levels in the environment and in humans: a meta-analysis. *Environ. Sci. Technol*, 45: 4668-4675.
- Zhou G, Chen Y, Liu S, Yao X, Wang Y. (2013).** *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extract from *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch. *J Ethnopharmacol*, 148: 664-670.
- Zhou J, Zhong X, Chen L, Yang X. (1996).** Abnormal expressions of hepatocellular proteins and extracellular matrix in CCL₄-induced liver injury in rats. *Chin. Med. J. Beijing-English Ed*, 109: 366–371.
- Zhu BZ, Shan GQ. (2009).** Potential mechanism for pentachlorophenol-induced carcinogenicity: a novel mechanism for metal-independent production of hydroxyl radicals. *Chem Res Toxicol*, 22: 969–977.
- Zhu WQ, Jian YW, Zhang Y, Xia M. (2012).** The anthocyanin cyanidin-3-O glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: involvement of a cAMPK-dependent signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 52 (2): 314–327.

Intitulé de thèse : L'effet protecteur des extraits des plantes (*Perralderia coronopifolia* et *Gaillonia reboudiana*) vis-à-vis d'une toxicité provoquée par le pentachlorophénol.

Résumé :

La présente étude a été réalisée afin d'évaluer les effets protecteurs et les propriétés biologiques des deux plantes endémiques *P. coronopifolia* et *G. reboudiana*. Les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de la plante *P. coronopifolia* ainsi que l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* montrent une richesse en composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes. Ces composés ont fourni un pouvoir antioxydant très important par rapport aux standards antioxydants. Ce pouvoir est justifié *in vitro* par la puissance réductrice et la grande capacité de piégeage des EROs, de chélation des métaux, d'inhibition de la peroxydation lipidique, de la protection d'ADN plasmidique contre les dommages oxydatifs induits par les EROs. Ainsi, une activité antiproliférative puissante de concentration plus élevée a été prouvée chez ces différents extraits, et spécialement chez les extraits examinés de la plante *P. coronopifolia* contre les lignes cellulaires de cancer C6 et HeLa.

Une autre étude a été effectuée à fin de prouver l'effet antioxydant *in vivo* et l'effet protecteur de ces extraits contre les altérations fonctionnelles et structurelles au niveau des foies, rein et cœur suite à une toxicité induite par le PCP (pendant deux semaines avec une dose de 20 mg/kg), chez des rattes adultes. Ces extraits agissent sur le maintien du système antioxydant contre les xénobiotiques.

Le PCP a causé des lésions du système électrique dans les membranes cellulaires via une augmentation significative du MDA, une diminution de l'activité de GPx, une diminution du taux de GSH et une importante perturbation des paramètres biochimiques sériques (une augmentation des concentrations d'AST, d'ALT, de bilirubines totaux, d'urée, de créatine, de cholestérol et de triglycérides).

Le prétraitement des rats avec l'extrait *n*-butanol de la plante *P. coronopifolia* et l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* montre qu'ils sont capables de normaliser le taux du MDA, du glutathion réduit, de l'activité de GPx dans les homogénats (des foies, des reins et des cœurs) et de normaliser les paramètres biochimiques dans les sérums des rattes traitées par le PCP. Le prétraitement avec ces extraits a montré qu'ils peuvent agir comme des terminateurs de chaîne radicalaire qui convertit les radicaux libres réactifs en produits stables et non réactifs, et aussi comme des chémo-protecteurs contre les dommages oxydatifs cellulaires induits suite à une ingestion du PCP.

Une étude histologique a été réalisée afin de confirmer leurs effets protecteurs contre la toxicité induite par le PCP, en protégeant l'architecture hépatique, rénale et cardiaque et en diminuant les altérations fonctionnelles et structurelles de ces organes.

Ces extraits ont bien montré des effets antioxydants, protecteurs d'ADN, des chémo-protecteurs, anticancéreux à des concentrations élevées, et des hépto-protecteurs contre la toxicité induite par le PCP chez des rats Wistar Albino.

Mots clés : *Perralderia coronopifolia* ; *Gaillonia reboudiana* ; Pentachlorophénol ; Polyphénols ; Activité antioxydante ; Activité anticancéreuse ; Hépto-toxicité.

Thesis title: The protective effects of extracts of *Perralderia coronopifolia* and *Gaillonia reboudiana* against the induced-toxicity by pentachlorophenol.

Abstract:

The present study was conducted to evaluate the protective effects and biological properties of the two endemic plants *P. coronopifolia* and *G. reboudiana*. The ethyl acetate acetate and *n*-butanol extracts of the *P. coronopifolia* plant as well as the metanolic extract of the *G. reboudiana* plant show richness in phenolic compounds and particularly flavonoids. These compounds provided a very important total antioxidant activity compared to standards antioxidant. This activity is justified *in vitro* by the reducing power and the large trapping capacity of the ROS, metal chelation, inhibition of lipid peroxidation, and plasmid DNA protection against oxidative damage induced by ROS. Thus, a potent antiproliferative activity of higher concentration has been proven in our various extracts, and especially in the extracts examined from the plant *P. coronopifolia* against the C6 and HeLa cancer cell lines.

Another study was carried out in order to prove the *in vivo* antioxidant effect and the protective effect of these extracts against functional and structural alterations in livers, kidneys and hearts following PCP-induced toxicity in adult rats (with a dose of 20 mg / kg/ day during two weeks). These extracts act on the maintenance of the antioxidant system against xenobiotics. In addition, PCP treatment caused damage to the electrical system in cells membranes via a significant increase in MDA levels, a decreased GPx activity, a decreased GSH levels and a significant disruption of serum biochemical parameters (increased levels of AST, ALT, total bilirubin, urea, creatine, cholesterol and triglycerides). Pre-treatment of rats with *n*-butanol extracts of the *P. coronopifolia* plant and metanolic extract of the *G. reboudiana* showed that they are able to normalize the MDA reduced glutathione levels and GPx activities (of liver, kidney and heart) and capable to regularise the biochemical parameters in serums of PCP-treated rats. Pre-treatment with these extracts has shown that they can act as radical chain terminators that converts reactive free radicals into stable, non-reactive products, and also as chemo-protectors against cellular oxidative damage (in liver, kidney and heart cells) induced by the PCP-treatment.

Following *our in vitro* and *in vivo* studies, a histological study was carried out to confirm their protective effects against PCP-induced toxicity, by protecting the architecture of liver, kidney and heart and decreasing the functional and structural alterations of these organs.

Our extracts showed strong antioxidant activity, DNA-protective capacity, high-potency anti-cancer effects and protective effects against PCP-induced toxicity in Wistar Albinos rats.

Key words: *Perralderia coronopifolia*; *Gaillonia reboudiana*; Pentachlorophenol; Polyphenols; Antioxidant activity; anticancer activity; Hepatotoxicity.

العنوان : التأثير الوقائي لمستخلصات نباتين محليين *Perraderia. coronopifolia* ، *Gaillonia reboudiana* ، اتجاه السمية المحرّضة بواسطة فينول خماسي الكلور.

ملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الآثار الوقائية والفعالية البيولوجية لنباتين محليين نبات *P. coronopifolia* ونبات *G. reboudiana*. مستخلص الأثيل ون- بيتانول لنبات *P. coronopifolia* والمستخلص الميثانولي لنبات *G. reboudiana* ، أظهروا إحتوائهم علي المركبات الفينولية وخاصة الفلافونويدات. هذه المركبات أكسبتها قدرة مضادة للأكسدة مقارنة مع بعض المعايير المضادة للأكسدة، كما أكدت الدراسات المخبرية لهذه القدرة من خلال إجراء تجارب بينت قدرة هذه المستخلصات على الفعل المضاد للأكسدة الكلية، القدرة الإختزالية، القدرة على إقتناص الجذور الجزرة، استخلاص المعادن، وتثبيط الأكسدة الفوقية للدهون، حماية الحمض النووي البلازميدي من الأضرار التأكسدية الناجمة عن الجذور الحرة.

كما أثبتت هذه الدراسة أن استعمال تراكيز عالية من هذه المسخلصات وخاصة مستخلص الإثيل أسيتات يؤدي إلى تثبيط النمو والنشاط التكاثري لبعض الخلايا السرطانية مثل خلايا C6 وخلايا HeLa.

اعتمدت هذه الدراسة على عدة طرق أثبتت نتائجها التأثير الوقائي الجد مهم لهذه المستخلصات في الحفاظ على النظام المضاد للأكسدة. ومن أجل تأكيد هذا التأثير الوقائي، تم الجوء إلى إجراء تجارب أخرى على حيوانات حية عن طريق تحريض سمية لمدة 15 يوم لدى جردان بالغين بواسطة جرعة 20 ملغ / كلغ يوميا من فينول خماسي الكلور (PCP).

توحي نتائج هذه الدراسة أن PCP أحدث تغييرات وظيفية وبنوية على مستوى الكبد ، الكلى والقلب ، لدى الجردان، حيث أتلّف النظام الكهربائي والدهني للأغشية الخلوية الكبدية، و يتبين ذلك من خلال زيادة كبيرة في مستوى ال MDA ، وانخفاض في نشاط GPx و مستويات GSH.و كذلك اضطراب تراكيز ال AST ، ALT ، البيليروبين الكلي ، اليوريا ، الكرياتين ، الكوليسترول والدهون الثلاثية في الدم.

أظهرت المعاملة المسبقة بمستخلصات ن-بيتانول *P. coronopifolia* والمستخلص الميثانولي لنبات *G. reboudiana* ، أنها قادرة على تحويل الجذور الحرة إلى مركبات مستقرة وغير فعالة، كما أنها فعالة كيميائيا ضد الضرر التأكسدي المحرض على مستوى خلايا الكبد، الكلى والقلب بواسطة ال PCP. حيث أن المعاملة بهذه المستخلصات تؤدي إلى تعديل مستوى ال MDA و GSH ونشاط ال GPx على مستوى الكبد وكذلك مستويات ال AST ، ALT ، البيليروبين الكلي ، اليوريا ، الكرياتين، الكليسترول والجليسيريدات الثلاثية في الدم.

من أجل تأكيد الدراسة المخبرية خارج العضوية والدراسة على الحيوانات الحية، أنجزت دراسة نسيجية لكبد، كلى وقلب كل جرد لتأكيد الآثار الوقائية للمستخلصات السمية الناجمة عن المعاملة بواسطة ال PCP. تشير نتائج هذه الدراسة إلى قدرة المستخلصات على حماية بنية كل من الكبد ، الكلى والقلب والتقليل من التغيرات الوظيفية والبنوية الطارئة علي هاته الأعضاء.

كما أظهرت مستخلصات النباتين فعالية مضادة للأكسدة، واقية للحمض النووي، فعالة كيميائيا، مضادة للسرطان عند تراكيز عالية، وواقية لكل من الكبد ، الكلى والقلب ضد السمية المحرّضة بواسطة ال PCP، عند جردان بالغين Wistar Albinos.

الكلمات المفتاحية:

Gaillonia reboudiana ، *Perraderia. coronopifolia* ، نشاط مضاد للأكسدة، فينول خماسي الكلور، سمية كبدية، نشاط مضاد للسرطان.



BJP

Bangladesh Journal of Pharmacology

Research Article

**Anti-oxidant, DNA-damage protection
and anti-cancer properties of *n*-
butanol extract of the endemic *Per-
rhalderia coronopifolia***

Anti-oxidant, DNA-damage protection and anti-cancer properties of *n*-butanol extract of the endemic *Perralderia coronopifolia*

Khaidija Bekhouche¹, Tefvik Ozen², Sara Boussaha³, Serkan Koldas⁴, Semiha Yenigun², Somia Lassed¹, Ibrahim Demirtas⁴, Fadila Benayache³, Samir Benayache³ and Djamila Zama^{1,3}

¹Departement of Animal Biology, Faculty of Natural and Life Sciences University of Mentouri 1 Constantine, Algeria;

²Department of Chemistry, Faculty of Science and Arts, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey; ³Research Unit and Valuation of Natural Resources, Bioactive Molecules, Physicochemical and Biological Analyzes (VARENBIOMOL), Constantine University 1 Constantine, Algeria; ⁴Plant Research Laboratory, Department of Chemistry, University of Cankiri Karatekin, Cankiri, Turkey.

Article Info

Received: 10 October 2017

Accepted: 19 February 2018

Available Online: 15 March 2018

DOI: 10.3329/bjp.v13i1.34255

Cite this article:

Bekhouche K, Ozen T, Boussaha S, Koldas S, Yenigun S, Lassed S, Demirtas I, Benayache F, Benayache S, Zama D. Anti-oxidant, DNA-damage protection and anti-cancer properties of *n*-butanol extract of the endemic *Perralderia coronopifolia*. Bangladesh J Pharmacol. 2018; 13: 82-89.

Abstract

This study was designed to evaluate *in vitro* the total phenolic, flavonoid content, anti-oxidant activity, oxidative DNA-damage protection and anti-cancer activity of *n*-butanol extract from *Perralderia coronopifolia*, endemic plant. DNA protection capacity was performed using 46966 plasmid DNA against UV-photolysis of H₂O₂-induced oxidative damage. The anti-proliferative effects of extract were performed on HeLa and C6 cells. Experimental results showed that extract had convenient number of phenolic and flavonoids. Furthermore, it provided strong anti-oxidant, reducing power, hydrogen peroxide and higher DPPH· scavenging ability with IC₅₀= 7.02 ± 0.02 µg/mL. As it shown an oxidative plasmid DNA-damage inhibition against UV-photolysis of H₂O₂, an anti-cancer activity at higher concentrations in cells. The data obtained that *P. coronopifolia* extract could be useful in human protection against infection and degenerative illness.

Introduction

Oxidative stress is the most important factor in the stimulation of certain chronic and degenerative illnesses. DNA damage is the important manifestation of long term ROS exposure, thereby inducing a various disorder in humans (Souri et al., 2008). Some findings suggest that DNA damage may be a major factor risk for several pathogenesis and deceases such as neurodegenerative (Lezza et al., 1999) and cardiovascular diseases (Collins et al., 1998), as well as diabetes (Dandona et al., 1996) and cancer (Kumar et al., 2012).

Anti-oxidants from natural or synthetic products provide novel possibilities to protect and treat oxidative damage by inhibiting or scavenging free radicals (Casa-

grande et al., 2006). The investigation of several parts of phenolic plants like fruit, vegetable, nut, seed, leaf, root and bark established their potent pharmacological activities and medicinal properties.

The current study report on *P. coronopifolia* (Asteraceae). It is one of the Algerian endemic species which is seemed to be used as a natural therapeutic remedy, grow in the elevated regions in the North-Western of Africa (Algeria, Morocco and Libya) (Boussaha et al., 2015). Considering the traditional therapeutic use of this plant, it is necessary to evaluate its biological and oxidative potentials.

Therefore, the main purpose of this study was to investigate the anti-oxidant and the anti-cancer pro-



properties of *n*-butanol extract from *P. coronopifolia* using *in vitro* models' systems to know its consumption of total phenolic content and flavonoids. As well as its anti-oxidant activity, reducing power, hydrogen peroxide scavenging, DPPH· scavenging and metal chelating activities. Furthermore, our study reports the inhibition of oxidative 46966 plasmid DNA-damage against UV-photolysis of H₂O₂, and the inhibition of proliferation of different cancer-cell lines.

Materials and Methods

Chemicals

The chemicals utilized in the tests were in analytical grade and purchased from the Sigma-Aldrich and Roche.

Plant material

The plant material (*P. coronopifolia*) was collected in 2011 at an elevated region located around Taghit in the South-West of Algeria. It was authenticated by M Mouhamed Ben Abdelhakem, manager of the wildlife preserving organization of Bechar. A label sample (PCA0511-TAG-ALG-52) was put at the herbarium of VARENBIOMOL Unit, University of Mentouri1, Constantine.

A dried aerial parts (1,400 g) of the plant were macerated for 48 hours at room temperature with ethanol-water (80:20, v/v), three often. The rest was concentrated and liquefied in 650 mL of water, after filtration. The resultant mixture was treated by chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol, respectively. The organic phases were dried over Na₂SO₄ and filtered by common filter paper and concentrated in vacuum at ambient temperature to get the chloroform (2 g), ethyl acetate (7 g) and *n*-butanol (40 g) extracts.

Anti-oxidant properties

Determination of total phenolic and flavonoid contents

Total flavonoid was measured by the Folin-Ciocalteus reagent (FCR) according to the method described by Singleton et al. (1999) using gallic acid (GA) as a standard phenolic compound. 100 µL of FCR and 1.6 mL of distilled water were mixed with 20 µL of extract. After 3-8 min, 0.3 mL of Na₂CO₃ was added. The absorbance of sample was read at 765 nm after 30 min of incubation at 37°C. The total phenolic compounds concentration of extract was quantitated as µg of gallic acid equivalent (GAE)/mg plant material with standard deviation.

Total flavonoid content was determined as described in a reference (Wang et al., 2008) using quercetin as standard. 0.5 mL of sample was added to of AlCl₃ (2%; 0.5 mL). The absorbance of sample was read at 420 nm lasting 1 hour of incubation. The quercetin was used as

a standard. The content of flavonoid compounds in extract was estimated as µg quercetin equivalent (QE)/mg plant material with standard deviation.

Determination of total anti-oxidant activity

The activity of the *n*-butanol extract was determined spectrophotometrically as mention in the phosphomolybdenum method (Prieto et al., 1999). This assay founded on the potent of reducing Mo(VI) to Mo(V) by the extract analyzed and the resulting of green phosphate/Mo(V) substances. The extract solution (0.3 mL) was mixed with 2.7 mL of the reagent solution prepared in ammonium molybdate (4 mM), sulfuric acid (0.6 M) and sodium phosphate (28 mM). The sample and standard solutions were left in a water bath at 95°C during 90 min. After cooling the samples to room temperature, the absorbance of the resulting green sample-phosphomolybdenum complex was read at 695 nm. For the blank, just a replacement of sample by 0.3 mL of ethanol. A typical blank solution contained 2.7 mL of reagent solution, after it was left under the similar conditions as sample. The activity was defined as the absorbance of the sample and standard. A higher absorbance value is indicative a higher anti-oxidant capacity.

Reducing power assay

The reducing power of *n*-butanol extract and standard anti-oxidants was measured spectrophotometrically using the method of Oyaizu (1986). This assay established on the reduction of the Fe⁺³-ferricyanide to the Fe⁺², by the reductant compounds in the mixture. 1 mL of the sample solutions (50-500 µg/mL) were added to 2.5 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide (1%; 2.5 mL). The mixtures were placed in a water bath at 50°C pending 20 min. The mixtures were centrifuged at 1000 x g for 20 min after adding of trichloroacetic acid (10%; 2.5 mL). Finally, the supernatant (2.5 mL) was added to 2.5 mL of distilled water and ferric chloride (0.5 mL; 0.1%). The mixture intensity of the bleu-green color was read at 700 nm. In this assay, the upper absorbance of sample indicates better reducing power under the reaction conditions.

H₂O₂ scavenging activity

H₂O₂ scavenging activity was measured as a slightly modification described by Zhao et al. (2006). 1 mL of sample was mixed with H₂O₂ (0.1 mM; 1 mL), ammonium molybdate (3%; 100 µL), H₂SO₄ (2 M; 10 mL) and KI (1.8 M; 7 mL). Finally, the mixture was titrated using Na₂S₂O₃ (5 mM) till disappearing yellow color. The reaction without sample was used like a control. The percentage of scavenging effect was calculated using the formula given below:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ scavenging activity, \%} = [(V_{\text{control}} - V_{\text{sample}}) / V_{\text{control}}] \times 100$$

Where, V_{control} is the volume of Na₂S₂O₃ and V_{sample} is the

volume of Na₂S₂O₃ solution H₂O₂ added to the test samples

DPPH[•] scavenging assay

DPPH[•] scavenging assay was performed according to the method in the literature (Braca et al., 2001). 3 mL of a methanol solution of DPPH[•] were mixed with 1 mL of sample in various concentrations (1-20 µg/mL). After 30 min incubation in the dark at room, absorbance was read at 517 nm. The inhibition percentage was determined using the formula:

$$\text{Inhibition, \%} = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

Where, A₁ is absorbance of sample and A₀ is absorbance of control

Metal chelating activity

The Fe²⁺ chelating activity of extract and standard antioxidants was measured as a mentioned assay by Dinis et al. (1994). The different concentrations (50-500 µg/mL) of the sample were added separately to 2 mM of FeCl₂ (0.05 mL) and left for incubation at room temperature for 5 min. The reaction was started by adding the ferrozine (5 mM; 0.3 mL). After shaking forcefully, the mixture was incubated at room temperature pending 10 min. EDTA was used as a positive control. Absorbance was read at 562 nm. The inhibition percentage of Fe²⁺-ferrozine complex creation was measured as the next formula:

$$\text{Chelating capacity, \%} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

Where, A₀ is the absorbance of the Fe²⁺-ferrozine complex and A₁ is the absorbance of the test solutions

DNA damage inhibition efficiency

DNA protection capacity of the test plant extract was performed as described by Russo et al. (2001), using photolyzing 46966 plasmid DNA (extracted from *E. coli*) through UV radiation in the presence of H₂O₂ and the performance of agarose gel electrophoresis with the irradiated DNA. 1 µL aliquot of 46966 plasmid (20 µg/mL) was put in polyethylene microcentrifuge tube, then 50 µg of *n*-butanol extract plant was added to single tube. One tube did not contain the extract was served as an irradiated control (C_R). Then, 4 µL of H₂O₂ (3%) was added into the tube (including C_R). Lastly, tubes were put on the outer face of a UV transilluminator (300 nm) and irradiated at room temperature during 10 min. Individual tube contains 1 µL aliquots of 46966 plasmid DNA was placed also, which performed as the non-irradiated control (CO). Samples were run on agarose gel (1%) and photographed using a Lourmat gel imaging system (Vilber).

Anti-cancer activity

The xCELLigence RTCA-SP (Real Time Cell Analyzer-Single Plate) instrument is a grouping of four parts: An E-Plate 96, a plate station, an analyzer and a computer

including RTCA software. It was used to evaluate the antiproliferative effects of the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* on HeLa and C6-cell lines (Demirtas et al., 2009).

HeLa (human cervix carcinoma) and C6 (rat brain tumor) cells were developed in DMEM-HG (Dulbecco's modified eagle's medium) with 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum) and 2% penicillin/streptomycin solution, at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

HeLa and C6-cells were detached from bottom of the culture flask using 10 mL trypsin-EDTA mixture. After detaching, the same volume of culture medium was placed in the flask and mixed thoroughly and put in centrifuge 600 rpm for 5 min (Nüve NF 800, Turkey). 5 mL of medium was mixed carefully with the supernatant. The concentration of cells in this suspension was determined using CEDEX HIRES Cell Counter.

50 µL of the medium was placed to every well of E-Plate 96 and left in the sterile cabinet for 15 min, then incubated for 15 min. 100 µL of the cell suspension (2.5 × 10⁴ cells/100 µL) was placed into wells. Exceptionally, 100 µL of 5-fluorouracil (5-FU) was added as a control in the last wells. The plate incubated in the hood for 30 min in order to adhere cells to the bottom, then attached to xCELLigence RTCA-SP station in the incubator. A measurement during 80 min was started. The extract solutions (50, 100 and 250 µg/mL) in DMSO were injected to the wells and adjusted until 200 µL using culture medium. The control and medium wells did not have any extract solutions. Lastly, the plate was placed in the incubator xCELLigence instrument and measurements were taken over 48 hours.

Statistical analysis

Data were presented as mean ± standard deviation of the mean of three parallel measurements. The analyses of results were performed by using the SPSS 18 Software and evaluated by t-test.

Results

The content of total phenolics and flavonoids

The *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* contained high phenolic compounds (444.0 ± 0.9 µg GAE/mg plant material) and flavonoids (400.3 ± 0.5 µg quercetine equivalents/mg plant material).

Total anti-oxidant activity

The extract has a high anti-oxidant activity, but it was inferior to those of anti-oxidant standards (Table I). All samples exhibited a concentration-dependent total antioxidant activity. At 500 µg/mL, *n*-butanol extract exerted a strongest anti-oxidant activity (3.0) and followed

Table I				
<i>In vitro</i> anti-oxidant activity of <i>P. coronopifolia</i> extract				
Sample	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL
Total anti-oxidant activity, 695 nm				
<i>n</i> -Butanol extract	0.03 ± 0.01	0.2 ± 0.01	1.5 ± 0.06	3.0 ± 0.1
Ascorbic acid	0.04 ± 0.02	0.3 ± 0.01	1.0 ± 0.07	2.7 ± 0.02
Butylated hydroxyanisole	0.07 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.7 ± 0.02	1.5 ± 0.06
Reducing power, 700 nm				
<i>n</i> -Butanol extract	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.01
Ascorbic acid	0.5 ± 0.005	1.1 ± 0.03	3.5 ± 0.2	3.8 ± 0.06
Butylated hydroxyanisole	0.3 ± 0.01	0.6 ± 0.02	1.2 ± 0.1	3.5 ± 0.05
Trolox	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.9 ± 0.05	1.9 ± 0.1
Hydrogen peroxide scavenging activity, %				
<i>n</i> -Butanol extract	31.7 ± 3.2	38.9 ± 2.7	47.6 ± 0.87	65.6 ± 0.5
Ascorbic acid	17.5 ± 0.8	34.1 ± 2.1	54.0 ± 0.9	66.7 ± 0.6
α -Tocopherol	30.2 ± 0.9	38.1 ± 0.9	47.6 ± 3.6	55.6 ± 0.8
Butylated hydroxyanisole	25.4 ± 3.2	41.3 ± 3.9	50.8 ± 4.1	60.3 ± 3.8
Trolox	31.7 ± 2.1	41.3 ± 0.8	46.0 ± 2.7	50.8 ± 0.6
Metal chelating activity, %				
<i>n</i> -Butanol extract	7.9 ± 1.3	29.2 ± 0.7	41.7 ± 2.0	50.9 ± 1.2
Ethylenediaminetetraacetic acid	10.2 ± 1.3	21.9 ± 0.7	37.5 ± 3.0	45.9 ± 1.2
Ascorbic acid	6.5 ± 2.7	10.6 ± 0.5	23.2 ± 1.2	40.6 ± 0.8
α -Tocopherol	6.2 ± 1.3	8.9 ± 1.8	20.2 ± 2.1	23.6 ± 3.2
Butylated hydroxyanisole	2.1 ± 0.4	21.1 ± 0.7	36.8 ± 3.7	52.6 ± 1.8

by ascorbic acid (2.7), and BHA (1.5).

Reducing power activity

The *n*-butanol extract showed a stronger reducing power comparable to those of anti-oxidant standards used as positive controls: Trolox, BHA, α -tocopherol and ascorbic acid (Table I). It increased with increasing concentrations, ($p < 0.05$) significantly.

H₂O₂ scavenging activity

The H₂O₂ scavenging activity of *n*-butanol extract was compared with ascorbic acid, α -tocopherol, BHA and trolox (Table I). It was determined that the hydrogen peroxide scavenging activities of the samples increased depending on the different concentrations. The H₂O₂ scavenging activity of *n*-butanol extract was higher than that of α -tocopherol, BHA and trolox ($p < 0.05$).

DPPH[•] scavenging activity

The measurements of DPPH[•] scavenging capacities of *n*-butanol extract and ascorbic acid as standard radical scavenger indicated in the order of ascorbic acid > *n*-butanol with IC₅₀ value of 5.0 ± 0.1 and 7.0 ± 0.02 µg/mL, respectively (Figure 1). The activity of extract was close to that of ascorbic acid.

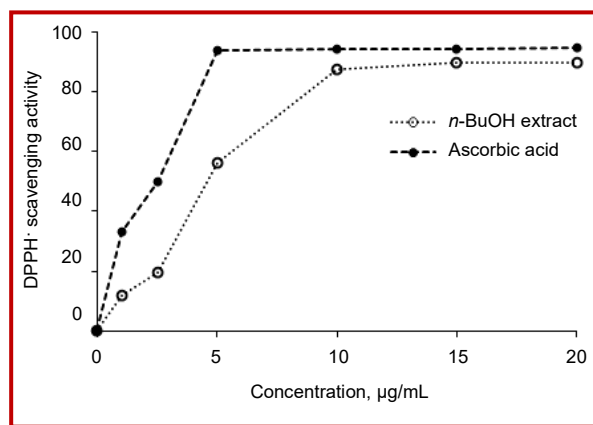


Figure 1: The free radical (DPPH[•]) scavenging of the *P. coronopifolia n*-butanol extract

Metal chelating activity

The *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* was able to chelate Fe²⁺ in a concentration-dependent manner (Table I). At 100 and 250 µg/mL, the metal chelating activity of extract showed higher than that of BHA and ascorbic acid. Except for BHA, the extract exhibited higher chelating activity than standards at 500 µg/mL.

DNA damage inhibition efficiency

Results showed that the extract at a dose of 50 μg was exhibited a completed protection of plasmid DNA. The circular (C) form of untreated DNA was converted into nicked form: Relaxed (R) and/or linear (L), which indicates the plasmid-DNA damaging. While the upon-treatment with *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* regained the DNA to its native circular form (Figure 2).

Anti-cancer activity

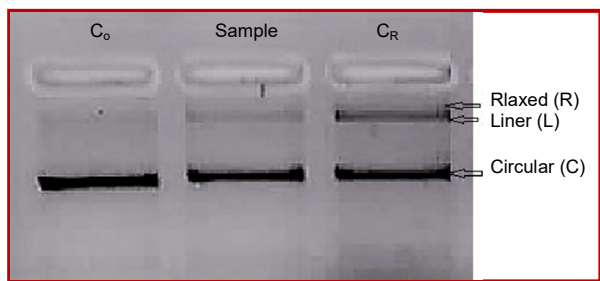


Figure 2: Effect of anti-cancer activity (50 μg) against oxidative to 46966 plasmid DNA damage caused by UV-photolysis of H₂O₂ (3%, v/v) C₀ = untreated non-irradiated DNA; Sample = DNA UV-irradiated treated with *n*-butanol extract of *P. coronopifolia*; C_R = untreated UV-irradiated DNA

Figure 3 exhibits the diagram of the anti-cancer test with deviation bars. In the present work as compared with the positive control, the extract revealed diverse profiles at diverse concentrations (250, 100 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As seen in diagram Figure 3A, during the first two hours cells not treated with extracts were observed a normal growth. 24 hours post-treatment, HeLa cells were inactivated by *n*-butanol extract and showed the maximum activity through the concentration of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Lower activities were obtained at lower concentrations (100 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), nearly same with control during the same period of time.

However, profiles exhibited dissimilarities at various time points, which lower concentrations indicated certain positive inhibition-activities against C6 cells-proliferation during 27 hours post-treatment. As shown in Figure 3C, after a short time they are missing their capacities of inhibition.

Discussion

The anti-oxidant activity of extract is the result of an existence of polyphenols and flavonoids, which possibly act upon by offering electrons and free radicals. Similar finding was obtained by Barros et al. (2007) and Ozen et al. (2011) on their studies on different extracts. Flavonoid compounds are the most essential plant elements by the reason of their $\cdot\text{OH}$ groups which can offer the anti-oxidant capacity (Kumar et al., 2008).

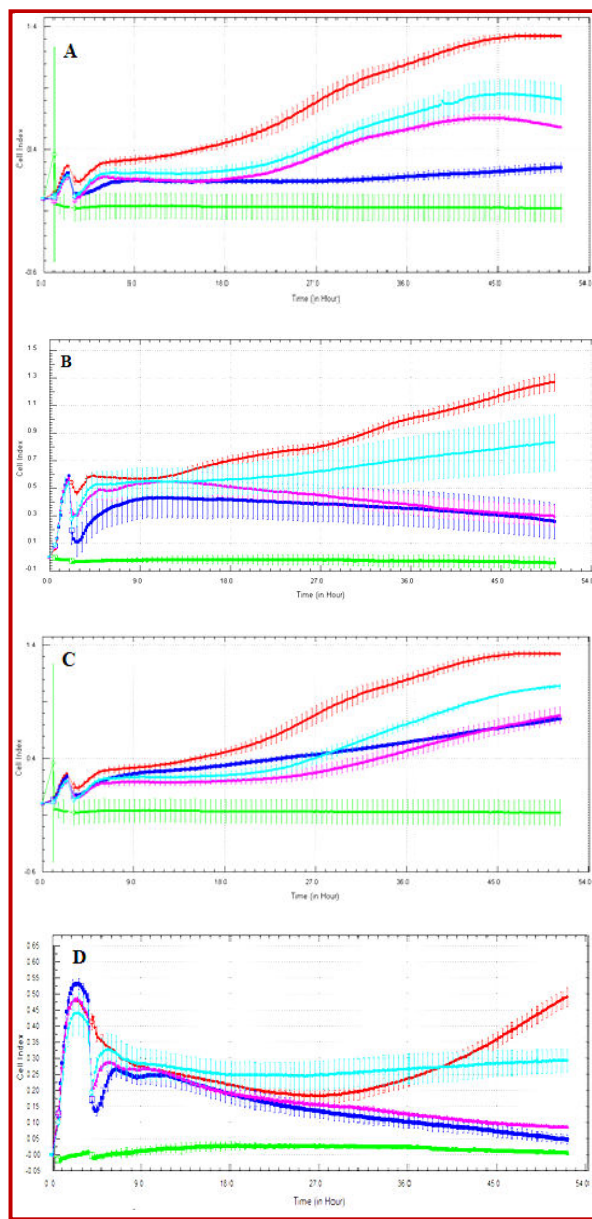


Figure 3: The anti-cancer activity of the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* against HeLa and C6 (2.5×10^4 cell/well) cells line at several extract concentrations (— 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, — 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, — 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, — Control, — Medium).

Proliferation assay of the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* (A) and the 5-fluorouracil as a positive control (B) against HeLa cells; Proliferation assay of the *n*-butanol extract of *P. Coronopifolia* (C) and the 5-fluorouracil as a positive control (D) against C6 cells

They have been shown to have potent anti-oxidant activity. The *n*-butanol extract shows that it can act as a radical chain terminator that converts reactive free radicals to stable and non-reactive products. This is the origin of their capability to prevent lipid peroxidation chain reactions by donating a hydrogen atom from their

·OH groups. In addition, it was reported that phenolic and flavonoid contents are related to anti-oxidant capacity and have a necessary role in stabilizing for the lipid peroxidation (Koldaş et al., 2015).

The literature reported that the reductive ability of products is commonly related with the existence of reductants like anti-oxidant constituents (Özen, 2010). The great reducing capacity of extract may be the result of its effective amount of phenols and flavonoid compounds. Like relations concerning Fe³⁺-reducing ability and polyphenols have been declared in the literature (Gao et al., 2000).

Clearly, the ability of our plant to scavenge hydrogen peroxide could be due to the presence of flavonoid compounds and phenols. Similar studies suggested that the elimination of hydrogen peroxide is very necessary for the prevention of the living process (Koldaş et al., 2015).

The free radical scavenging activity was also increased with increasing extracts concentrations. Our data clearly indicated that the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* is a powerful free radical inhibitor. This result can consider to be noteworthy when compared to the finding of Boussaha et al. (2015) which suggests that this anti-oxidant ability can be attributed to extract's content of flavonoids like taxifolin, rhamnazin and caffeoylquinic acid derivatives determined in this plant.

The formation of ferrozine-Fe²⁺ complex is disrupted in the presence of *n*-butanol extract which indicates that it chelates iron. The metal chelating capacity of *n*-butanol extract was increased by increasing concentration. It was indicated that chelating compounds making α -bands with a metal are lesser anti-oxidants owing to reduction of the redox potential. It was reported in the literature that iron can provoke lipid peroxidation by Fenton-reaction, as can quicken it by decomposition of lipid hydroperoxides to peroxy (LO₂) and alkoxy (LO) radicals which may be able to capture hydrogen and propagate the formation of lipid peroxidation (Gutteridge, 1984).

ROS are known to have numerous damaging effects on the cells of the body. They severely induce lesions in DNA as deletions, mutations and genetic effects. Natural products in medicinal plants can scavenge the ROS generated by severing oxidative stress (Guha et al., 2011). Diverse study findings suggest that some plant extracts can protect DNA from oxidative damage by their anti-oxidant compounds (Arora et al., 2017). According to the reports, plant extract was practical to prevent DNA from oxidative injury induced by UV-photolysis of H₂O₂ (Lassed et al., 2015).

The current study was based on the ability of the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* to protect 46966 plasmid DNA against UV-photolysis of H₂O₂-induced

oxidative damage. Exposure of plasmid to UV-photolysis of H₂O₂ results in generation of hydroxyl radicals (OH). These radicals are known to cause oxidatively breakage of DNA strands, fragmentation of deoxy-sugars, modification of bases, oxidation of lipids and generation of end products like malondialdehydes and other unsaturated aldehydes, which can bind to DNA and result in mutagenic adducts (Chaudhary et al., 1994). According to the cumulative level of DPPH-scavenging, anti-oxidant activity, reducing power, hydrogen peroxide scavenging and metal chelating assays, the extract may provide DNA protection.

The electrophoretic pattern of 46966 plasmid-DNA using UV-photolysis of H₂O₂ in the absence or presence of extract. At a dose of 50 μ g the extract exhibited a complete protection of plasmid DNA, which indicates that the plasmid-DNA damaging is caused by hydroxyl radicals. The upon-treatment with *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* protects the plasmid DNA from the hydroxyl radicals generated by UV-photolysis of H₂O₂. This investigation exhibits a noteworthy correlation between anti-oxidant potential and DNA protection. These results suggest that DNA loss inhibition may possibly owe to the great anti-oxidant capacity of the *n*-butanol extract of *P. coronopifolia*.

As compared with the positive control, the extract exposed varied profiles at different concentrations. HeLa cells were inactivated by *n*-butanol extract and showed the maximum activity at the concentration of 250 μ g/mL. However, C6 cells recovered from the inhibition in few hours. This possibly due to the lower concentration of active biomolecules in the plant extract, then cells initiated to proliferate after a few hours of inhibition.

The activity of higher concentration might be due to the chemical profiles as the high conception of polyphenolic and flavonoid content (Yaglioglu et al., 2013). While the diminution of this capacity might cause by the low bioactive molecule content of the plant extract which degraded within the time, cells can continue to grow and reproduce after inactivation. This *n*-butanol extract-findings agreed with the results of another study which suggests that the ethyl acetate extract of the same plant has an anti-oxidant potent and can inhibit the proliferation of HeLa and C6-cell lines at high concentrations with no cytotoxic effect observed (Boussaha et al., 2015).

Conclusion

The *n*-butanol extract of *P. coronopifolia* has possessed a positive DNA-damage protection ability, offered by its significant anti-oxidant potential. As compared with 5-fluorouracil, the findings suggest that our extract has a positive anti-cancer activity against HeLa cells at high

concentration.

Acknowledgement

This study was supported by the grants from the Algerian Ministry of Higher Education, Turkish State Planning Organization (DPT2010K120720), Çankırı Karatekin University (BAP Project: FF080515B30) and Ondokuz Mayıs University (BAP Project: PYO.FEN.1904.13.003).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

References

- Arora N, Tripathi D, Pandey N, Rai KK, Rai SK, Pandey-Rai S. Study of anti-oxidant, anti-inflammatory, and DNA-damage protection properties of some Indian medicinal plants reveal their possible role in combating psoriasis. *Int J Appl Sci Biotechnol.* 2017; 5: 141-49.
- Barros L, Baptista P, Ferreira IC. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on anti-oxidant activity measured by several biochemical assays. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45: 1731-37.
- Boussaha S, Bekhouche K, Boudjerda A, Leon F, Koldas S, Yaglioglu AS, Demirtas I, Brouard I, Marchioni E, Zama D. Chemical constituents, *in vitro* anti-oxidant and anti-proliferative activities of *Perralderia coronopifolia* Coss. subsp. eu-coronopifolia M. var. typica M. extract. *Rec Nat Prod.* 2015; 9: 312-22.
- Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I. Anti-oxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J Nat Prod.* 2001; 64: 892-95.
- Casagrande R, Georgetti SR, Verri WA, Dorta DJ, dos Santos AC, Fonseca MJ. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J Photochem Photobiol B.* 2006; 84: 21-27.
- Chaudhary AK, Nokubo M, Reddy GR, Yeola SN, Morrow JD, Blair IA, Marnett LJ. Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science* 1994; 265: 1580-82.
- Collins AR, Gedik CM, Olmedilla B, Southon S, Bellizzi M. Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: Large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. *FASEB J.* 1998; 12: 1397-400.
- Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 1996; 347: 444-45.
- Demirtas I, Sahin A, Ayhan B, Tekin S, Telci I. Antiproliferative effects of the methanolic extracts of *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis*. *Rec Nat Prod.* 2009; 3: 104-09.
- Dinis TC, Madeira VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 315: 161-69.
- Gao X, Björk L, Trajkovski V, Uggla M. Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *J Sci Food Agric.* 2000; 80: 2021-27.
- Guha G, Rajkumar V, Ashok Kumar R, Mathew L. Therapeutic potential of polar and non-polar extracts of *Cyanthillium cinereum in vitro*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011: 1-10.
- Gutteridge JM. Ferrous ion-EDTA-stimulated phospholipid peroxidation. A reaction changing from alkoxyl-radical-to hydroxyl-radical-dependent initiation. *Biochem J.* 1984; 224: 697-701.
- Koldaş S, Demirtas I, Ozen T, Demirci M A, Behçet L. Phytochemical screening, anti-cancer and anti-oxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. *J Sci Food Agric.* 2015; 95: 786-98.
- Kumar A, Pant MC, Singh HS, Khandelwal S. Assessment of the redox profile and oxidative DNA damage (8-OHdG) in squamous cell carcinoma of head and neck. *J Canc Res Ther.* 2012; 8: 254-59.
- Kumar PS, Sucheta S, Deepa VS, Selvamani P, Latha S. Anti-oxidant activity in some selected Indian medicinal plants. *Afr J Biotechnol.* 2008; 7: 1826-28.
- Lassed S, Amrani A, Altun M, Zama D, Demirtas I, Benayache F, Benayache S. *In vitro* anti-oxidant, inhibition of oxidative DNA damage and antiproliferative activities of ethanolic green tea (*Camellia sinensis*) extract. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2015; 35: 36-42.
- Lezza A, Mecocci P, Cormio A, Beal MF, Cherubini A, Cantatore P, Senin U, Gadaleta M. Area-specific differences in OH8dG and mtDNA4977 levels in Alzheimer disease patients and aged controls. *J Anti-Aging Med.* 1999; 2: 209-16.
- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. *Jpn J Nutr.* 1986; 44: 307-15.
- Ozen T, Darcan C, Aktop O, Turkecul I. Screening of antioxidant, antimicrobial activities and chemical contents of edible mushrooms wildy grown in the Black Sea region of Turkey. *Comb Chem High T Scr.* 2011; 14: 72-84.
- Özen T. Anti-oxidant activity of wild edible plants in the Black Sea Region of Turkey. *Grasas Aceites.* 2010; 61: 86-94.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of anti-oxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.* 1999; 269: 337-41.
- Russo A, Izzo A, Cardile V, Borrelli F, Vanella A. Indian medicinal plants as antiradicals and DNA cleavage protectors. *Phytomedicine* 2001; 8: 125-32.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 299: 152-78.
- Souri E, Amin G, Farsam H. Screening of anti-oxidant activity

- and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. DARU J Pharm Sci. 2008; 16: 83-87.
- Wang H, Gao XD, Zhou GC, Cai L, Yao WB. *In vitro* and *in vivo* anti-oxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. Food Chem. 2008; 106: 888-95.
- Yaglioglu AS, Akdulum B, Erenler R, Demirtas I, Telci I, Tekin S. Anti-proliferative activity of pentadeca-(8E, 13Z) dien-11-yn-2-one and (E)-1, 8-pentadecadiene from *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. roots. Med Chem Res. 2013; 22: 2946-53.
- Zhao GR, Xiang ZJ, Ye TX, Yuan YJ, Guo ZX. Anti-oxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. Food Chem. 2006; 99: 767-74.
-

Author Info

Tevfik Ozen (Principal contact)
e-mail: tevfikoz@omu.edu.tr

Chemical Constituents, *in vitro* Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Perralderia coronopifolia* Coss. subsp. *eu-coronopifolia* M. var. *typica* M. extract

Sara Boussaha¹, Khadidja Bekhouche¹, Azzedine Boudjerda¹, Francisco León², Serkan Koldaş³, Ayse Sahin Yaglioglu³, İbrahim Demirtaş³, Ignacio Brouard², Eric Marchioni⁴, Djamila Zama¹, Samir Benayache¹ and Fadila Benayache^{1*}

¹Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie

²Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, CSIC, Av. Astrofísico Fco. Sánchez, 3, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain

³Plant Research Laboratory, Chemistry Department, Çankırı Karatekin University, Ballica Campus, 18100 Çankırı, Türkiye

⁴Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives (IPHC-LC4, UMR 7178), Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 Route du Rhin, 67400 Illkirch, France.

(Received April 04, 2014; Revised September 28, 2014; Accepted October 09, 2014)

Abstract: Phytochemical investigations of extracts from the aerial parts (leaves and flowers) of *Perralderia coronopifolia* Cosson resulted in the isolation of nine secondary metabolites corresponding to three flavonoids: rhamnazin (**1**), chrysofenol D (**3**), and (2R, 3R) taxifolin (**4**), two monoterpene glycosides: myrtenol-β-D-glucopyranoside-6'-O-acetate (**2**) and myrtenol β-D-glucopyranoside (**7**), a disaccharide: sucrose (**9**) and three di-O-caffeoylquinic acid derivatives: methyl 3, 5-di-O-caffeoyl quinate (**5**) and methyl 3,4-di-O-caffeoyl quinate (**6**) as a mixture and 1,5-di-O-caffeoylquinic acid (**8**). The structures were identified by spectroscopic methods such as ¹H and ¹³C NMR, COSY, HSQC and HMBC experiments, HRESI-MS and comparison with literature data. Myrtenol-β-D-glucopyranoside-6'-O-acetate (**2**) was isolated in pure and native state for the first time. The other compounds are new for the genus *Perralderia* Cosson. The ethyl acetate extract showed a high antioxidant effect, especially DPPH radical scavenging activity with IC₅₀=7.01±0.28μg/mL compared to ascorbic acid (IC₅₀= 5±0.1μg/mL). This extract also showed antiproliferative activity against HeLa (human cervix carcinoma) and C6 (rat brain tumor) cells.

Keywords: Asteraceae; *Perralderia coronopifolia*; flavonoids; caffeoylquinic acids; terpenoids; antioxidant activity; antiproliferative activity. © 2015 ACG Publications. All rights reserved.

1. Introduction

The North African genus *Perralderia* (Asteraceae – Inuleae – Inulinae) includes three species. They grow in the elevated regions of Morocco, Algeria and Libya in the north-western part of the African continent, primarily in the mountainous regions. *Perralderia paui* Font Quer is found in the North of Morocco, *P. garamantum* Asch occurs in Libya and *P. coronopifolia* Coss. which includes two subspecies, subsp. *purpurascens* (Coss. ex Batt.) M. and subsp. *eu-coronopifolia* M. with two varieties, var. *typica* M. and var. *designyana* (Hochr.) M. grow in Algeria [1, 2]. As part of our ongoing program of research of new molecules with potential biological activity from plants [3-10], we report our results on *P. coronopifolia* Coss. subsp. *eu-coronopifolia* M. var. *typica* M. growing in the Algerian Sahara. Our first selection criterion for this plant was based on the fact that considering the difficult conditions to which

Saharan plants are subjected (hydrous insufficiency and oxidative stress), they are likely to accumulate specific secondary metabolites to survive, to adapt and to develop. Moreover, in the best of our knowledge, no reports on the isolation of any secondary metabolites from this plant are available to date. In the present work on the chemical constituents of the chloroform and ethyl acetate soluble parts of the aqueous-EtOH extract of the aerial parts (leaves and flowers), an acylated monoterpene glucoside has been isolated in pure and native state for the first time, together with eight known secondary metabolites. We report here the chemical study of these compounds, the free radical DPPH scavenging potential, the antiproliferative activities against HeLa (human cervix carcinoma) and C6 (rat brain tumor) cells of the ethyl acetate soluble part.

2. Materials and Methods

2.1. General

UV spectra were recorded using a Shimadzu model UV-1700 spectrophotometer. NMR spectra were obtained by Bruker model Avance 400 and AMX-500 spectrometers with standard pulse sequences, operating at 400 and 500 MHz for ^1H and 100 and 125 MHz for ^{13}C , respectively. MeOH- d_4 , DMSO- d_6 or CDCl_3 were used as solvents and TMS as internal standard. EIMS were taken on a Micromass model Autospec (70 eV) spectrometer. HRESI-MS was performed with a LCT Premier XE Micromass Waters spectrometer in positive ionization mode (Waters Corporation). Column chromatography (CC) was carried out with Si gel Fluka (cat. 60737) (40-63 μm), and column fractions were monitored by TLC Si gel 60 F254, 0.2 mm, Macherey Nagel (cat. 818-333) by detection with a spraying reagent ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$; 80:16:4) followed by heating at 100 $^\circ\text{C}$. Preparative TLC was carried out on Si gel 60 PF254 + 366 (20 \times 20 cm, 1 mm thickness, Analtech cat. 02014).

2.2. Plant material and chemicals

The plant material was collected from the area of Taghit in the south-west of Algeria on May 2011 and authenticated by M. Mohamed Benabdelhakem, director of the nature preservation agency, Bechar. A voucher specimen (PCA0511-TAG-ALG-52) has been deposited at the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit, Constantine 1 University. The chemicals which were used for the assays were in analytical grade and obtained from Sigma–Aldrich and Roche.

2.3. Extraction and Isolation

Air-dried leaves and flowers (1400 g) of *Perralderia coronopifolia* (Asteraceae) were macerated at room temperature with EtOH– H_2O (80:20, v/v) for 48 h, three times. After filtration, the filtrate was concentrated and dissolved in H_2O (650 ml). The resulting solution was extracted successively with CHCl_3 , EtOAc and *n*-butanol. The organic phases were dried with Na_2SO_4 , filtered using common filter paper and concentrated in vacuum at room temperature to obtain the following extracts: CHCl_3 (2 g), EtOAc (7 g) and *n*-butanol (40 g).

The CHCl_3 extract was fractionated by CC (silica gel; *n*-hexane/EtOAc step gradients and then with increasing percentages of MeOH) to yield 24 fractions (F_1 – F_{24}) obtained by combining the eluates on the basis of TLC analysis. Fraction F_{15} (70 mg) (*n*-hexane/EtOAc, 65:35), was submitted to preparative plates of silica gel TLC (CHCl_3 /EtOAc, 1:1) and purified on a Sephadex LH-20 column to give rhamnazin (**1**) (2 mg) [11]. Fraction F_{17} (277 mg) (*n*-hexane/EtOAc, from 55:45 to 45:55) was chromatographed on a silica gel column (CHCl_3 /EtOAc) to give myrtenol- β -*D*-glucopyranoside-6'-*O*-acetate (**2**) (56 mg) [12]. The EtOAc extract (7 g) was chromatographed on a silica gel column (CH_2Cl_2 /Me $_2\text{CO}$ step gradients and then with increasing percentages of MeOH) to yield 25 fractions (Fr_1 – Fr_{25}) according to their TLC behavior. Fraction Fr_7 (90.4 mg) (CH_2Cl_2 /Me $_2\text{CO}$, 75:25) was submitted to preparative silica gel TLC (CHCl_3 /MeOH/ H_2O , 9.8:1.1:0.1) and purified over Sephadex LH-20 column eluted with MeOH to afford

chrysosplenol D (**3**) (3 mg) [13, 14] and (2R, 3R)-taxifolin or dystilin (**4**) (4 mg) [15]. Fraction Fr₁₃ (82 mg) (CH₂Cl₂/Me₂CO, 70:30) was fractionated on a Sephadex LH-20 column using MeOH as eluent to give 7 sub-fractions. Sub-fractions 3 and 4 which had similar composition were combined and submitted to preparative TLC (CHCl₃/MeOH/H₂O, 8:2:0.1) and further purified by Sephadex LH-20 column using MeOH for elution to yield a mixture of methyl 3, 5-di-*O*-caffeoyl quinate (**5**) [16, 17] and methyl 3, 4-di-*O*-caffeoyl quinate (**6**) (18 mg) [18]. In this paper, the numbering of the quinic acid ring follows the new IUPAC nomenclature recommendation. Fraction Fr₁₅ (219 mg) (CH₂Cl₂/Me₂CO, 66:34) was rechromatographed on a silica gel column (*n*-hexane/Et₂O step gradients and then with increasing percentages of EtOAc) to give myrtenol β-*D*-glucopyranoside (**7**) (9 mg) [19, 20]. Fraction Fr₂₀ (129 mg) (CH₂Cl₂/Me₂CO, 16:84) was further applied to a Sephadex LH-20 column using MeOH for elution to obtain 8 sub-fractions. Sub-fraction 6 was purified over Sephadex LH-20 column to afford 1, 5-di-*O*-caffeoylquinic acid (**8**) (13 mg) [21]. Fraction Fr₂₃ (332 mg) (100% Me₂CO) gave after purification by crystallization in MeOH, sucrose (**9**) (7.5 mg) [22, 23] (Figure 1).

2.4. Cell culture

HeLa (human cervix carcinoma) and C6 (rat brain tumor) cells were grown in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Sigma), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma, Germany) and 2% Penicillin-Streptomycin (Sigma, Germany) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

2.5. Antiproliferative Activity

2.5.1. Preparation of Cell Suspension

HeLa cells in the culture flask were detached from bottom of flask by 10 mL Trypsin-EDTA solution. After detachment, 10 mL of medium was added into the flask and mixed thoroughly. This suspension was transferred to Falcon tubes and centrifuged at 600 rpm for 5 min. After removing the supernatant, 5 mL of medium was added to Falcon tube and mixed carefully. Cell concentration of this cell suspension was measured by CEDEX HiRes Cell Counter which uses Trypan Blue.

2.5.2. Preparation of E-Plate 96

50 μL of medium was added into each well of E-Plate 96. The plate was incubated in the hood then in the incubator for 15 min in each time. After this period, the E-Plate 96 was inserted to the RTCA-SP station and a background measurement was performed. Then 100 μL of the cell suspension (2.5x10⁴ cells/100 μL) was added into wells, except in the last three wells where only 100 μL of medium was added to check if there would be an increase from culture medium. The plate was left in the hood for 30 min, and then inserted to xCELLigence station in the incubator. A measurement was performed for 80 min. Extract was dissolved in DMSO to a final concentration of 20 mg/mL. 25 μL of this solution was mixed with 475 μL of medium. The extract solutions (50, 20 and 10 μL equivalent to 250, 100 and 50 μg/mL concentrations, respectively) were added into the wells and the final volumes were completed to 200 μL with medium. No extract solution was added into control and medium wells. Then the plate was inserted to xCELLigence station in the incubator and a measurement for 48 h was started.

2.6. Cell Proliferation Assay

Cells were plated in 96-well culture plates (COSTAR, Corning, USA) at a density of 30.000 cells per well. Vehicle (DMSO), 5-FU, cisplatin and several samples in various concentrations (5-100 μg/mL) were added to each well. Cells were then incubated overnight before applying the BrdU Cell Proliferation ELISA assay reagent (Roche, Germany) according to the manufacturer's procedure. Briefly, cells were pulsed with BrdU labeling reagent for 4 h followed by fixation in FixDenat solution for 30 min at room temperature. Thereafter, cells were incubated with 1:100 dilution of anti- BrdU-POD for 1.30 h at room

temperature. The amount of cell proliferation was assessed by determining the A450 nm of the culture media after addition of the substrate solution by using a microplate reader (Ryto, China). Results were reported as percentage of the inhibition of cell proliferation, where the optical density measured from vehicle-treated cells was considered to be 100% of proliferation. All assays were repeated at least twice using against HeLa and C6 cells. Percentage of inhibition of cell proliferation was calculated as follows: $(1 - A_{\text{treatments}} / A_{\text{vehicle control}}) \times 100$.

Stock solution of the samples, 5-FU were dissolved in sterile DMSO and diluted Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; 1:20). DMSO final concentration is below 1% in all tests.

2.7. Lactate Dehydrogenase (LDH) leakage assay

LDH leakage assay was carried out using LDH cytotoxicity detection kit by Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany according to protocol in the user's manual. At 100 concentrations that was the highest dose at antiproliferative activity test were determined cytotoxicity (%) against HeLa cell line. 5-FU were used as positive control. Samples and 5-FU were incubated with 100 μ L of C6 cell suspension having 5×10^3 cells/mL in 96-well plates at 37°C for overnight in 5% CO₂ atmosphere. All the control and tested substances were tested in triplicates and twice and mean \pm SEM of the absorbance value were taken to calculate the percentage of cytotoxicity.

Cytotoxicity % = [(Triplicate absorbance – low control) / (High control – low control)] x 100

2.8. Statistical Analysis

The results of this investigation are the means \pm SEM of six measurements for each cell type. Differences between treatment groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and *p* values < 0.01 and 0.05 were considered statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. Structure elucidation

Compound **2** was previously found in *Platychaete aucheri* Boiss. (Compositae) but purified as its tetraacetate after acetylation reaction [12]. In our study, we obtained it in pure and native state. Its positive mode HRESI-MS spectrum presented [M+Na] ion at *m/z* 379.1732 (100%) according to the molecular formula C₁₈H₂₈O₇ (calculated for C₁₈H₂₈O₇Na: 379.1733), indicating a compound containing 5 unsaturations. The ¹³C- and DEPT NMR spectra of this compound confirmed the presence of the 18 carbon atoms. The ¹³C NMR spectrum showed six characteristic signals of a hexose group notably: a CH₂ at δ_C 63.6 (δ_H = 4.34, m, 2H) assigned to C-6', a CH at δ_C 100.8 (δ_H 4.28, d, *J*=7.6 Hz, 1H) assigned to the anomeric carbon C-1'. The values of the chemical shift of this carbon and the coupling constant indicated an *O*- β -glycosylated compound. In the COSY spectrum, the anomeric proton H-1' led to the assignment of H-2' as a multiplet at δ_H 3.39 (δ_C 73.5). On the same spectrum, H-2' showed a correlation with the proton corresponding to a triplet at δ_H 3.55 ppm (*J*=8.4 Hz) which was attributed to H-3' (δ_C 76.3). The multiplicity of this signal and the value of the coupling constant indicated axial-axial interactions between H-3'/H-2' and H-3'/H-4'. This observation led to a glucosylated compound. Moreover, in the HMBC spectrum, H₂-6' showed correlation with the carbone of the carbonyl at δ_C 171.5 ppm, which showed a correlation with the protons of the methyl at δ_H 2.10 indicating the presence of an acetate group on the C-6 position of the glucosyle moiety. Considering the molecular formula C₁₈H₂₈O₇ and the presence the sugar moiety, the formula of the aglycone moiety of compound **2** was C₁₀H₁₅. Thus, compound **2** was a monoterpene glucoside 6'-acetate. Besides the signals of the sugar moiety, the ¹³C- and DEPT NMR spectra of compound **2** showed two CH₃ (δ_C 20.9 and 26.2), three CH₂ (δ_C 71.8, 31.3 and 31.4), three CH (δ_C 40.8, 43.3 and 121.4 and two quaternary carbon atoms (δ_C 144.0 and 38.0). The values of the chemical shifts of the carbon atoms indicated that the sugar was attached to the CH₂ at δ_C 71.8 and also indicated the presence

of a double bond and two cycles in the monoterpene moiety. Complete ^1H and ^{13}C connectivity was established by extensive use and interpretation of 2D NMR experiments spectra (COSY, HSQC, HMBC and ROESY). The proton and carbon signals due to this monoterpene moiety were in good agreement with those of the aglycone of sacranoside A isolated from the underground part of *Rhodiola sacra* (Prain ex Hamet) S. H. Fu (Crassulaceae) [19]. Thus, compound **2** was myrtenol- β -D-glucopyranoside-6'-O-acetate.

The structures of known compounds were established by spectral analysis, mainly the HRESI-MS, the ^1H -, ^{13}C -, and 2D-NMR (COSY, ROESY, HSQC and HMBC) as well as by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature.

Myrtenol- β -D-glucopyranoside-6'-O-acetate (2): yellow oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5.55 (1H, br s, H-3), 4.13 (1H, br d, $J = 12.4$ Hz, H-10a), 4.04 (1H, br d, $J = 12.4$ Hz, H-10b), 2.39 (1H, m, H-6a), 2.28 (2H, br d each one, $J = 20.8$ Hz, H-4a and H-4b), 2.18 (1H, m, H-1), 2.10 (1H, m, H-5), 1.29 (3H, s, H-9), 1.16 (1H, dl, $J = 8.7$ Hz, H-7b), 0.82 (3H, s, H-8), 4.34 (2H, m, H₂-6'), 4.28 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 3.55 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-3'), 3.40-3.48 (2H, m, H-4', H-5'), 3.39 (1H, m, H-2'), 2.10 (3H, s, OAc); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 144.0 (C, C-2), 121.4 (CH, C-3), 71.8 (CH₂, C-10), 43.3 (CH, C-1), 40.8 (CH, C-5), 38.0 (C, C-6), 31.4 (CH₂, C-4), 31.3 (CH₂, C-7), 26.2 (CH₃, C-9), 20.9 (CH₃, C-8), 100.8 (CH, C-1'), 76.2 (CH, C-3'), 73.7 (CH, C-5'), 73.5 (CH, C-2'), 70.1 (CH, C-4'), 63.6 (CH₂, C-6'), 171.5 (C, COO), 21.0 (CH₃, OAc); HR-ESIMS (+): m/z 379.1732 (calcd. 379.1733 for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_7\text{Na}$).

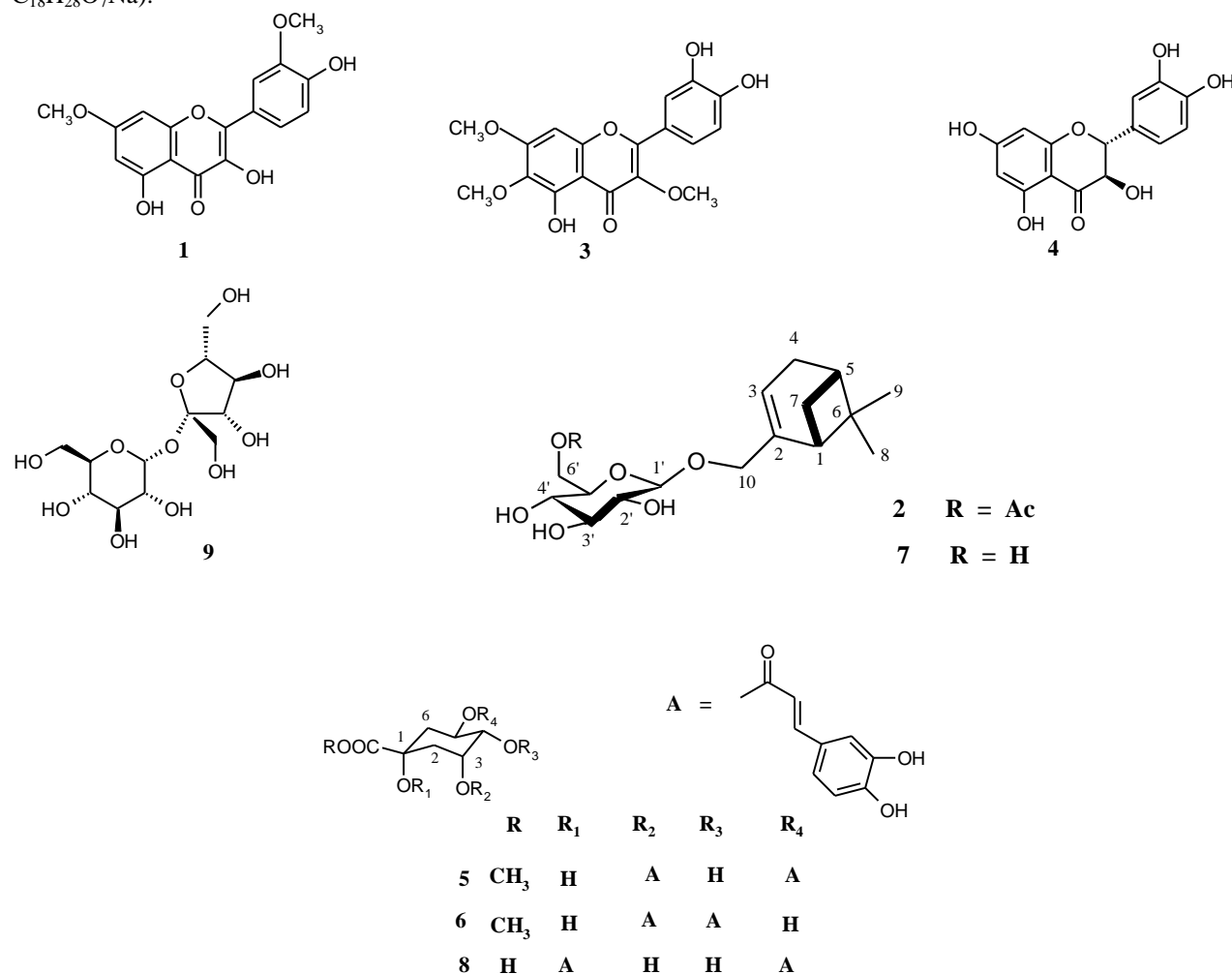


Figure 1. Structures of the isolated compounds **1-9**

3.2. Biological activities

3.2.1. Antioxidant activity

The free radical scavenging activity of ethyl acetate extract was evaluated through its ability to quench 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical [24]. Many studies showed that chemical structure has an important impact on radical scavenging activity. The high antioxidant activity depends on their molecular structure, the number and the position of the hydroxyl groups [25]. Effective antioxidant activities were observed in comparison to ascorbic acid. Comparing IC_{50} values, we observed that ethyl acetate extract of *P. coronopifolia* showed a high scavenging effect against DPPH radicals with $IC_{50}=7.01\pm 0.28\mu\text{g/mL}$ compared to ascorbic acid ($IC_{50}= 5\pm 0.1\mu\text{g/mL}$ (Figure 2). This activity is possibly due to the presence of the flavonoids: taxifolin [26], rhamnazin [27] and caffeoylquinic acid derivatives found in this plant [28].

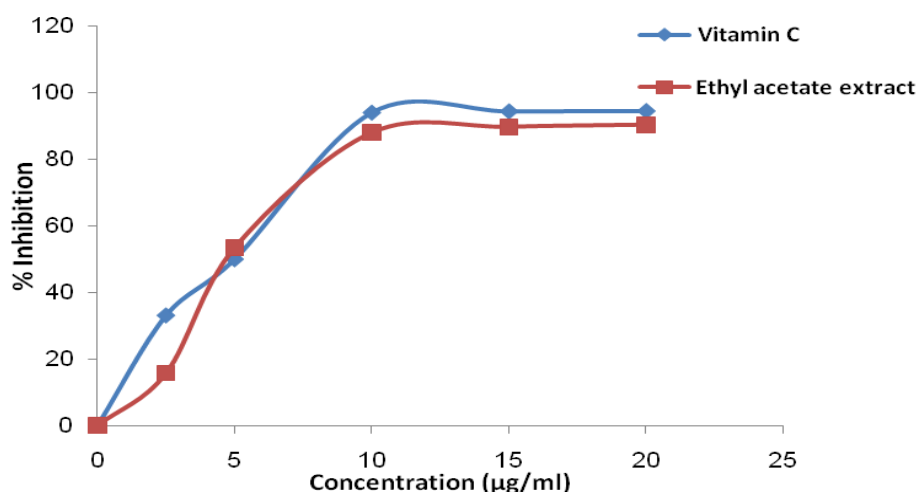


Figure 2. DPPH scavenging activity of ethyl acetate extract and vitamin C. Values are mean \pm SD of three samples analyzed, individually in triplicate

3.2.2. Anticancer activity

Anticancer activity is highly studied for the medicinal plants and other natural sources [29]. However, phytochemical and cytotoxic, antitumor/anticancer investigations on *P. coronopifolia* have not been studied so far. The anticancer activity of ethyl acetate soluble part of the aqueous-EtOH extract of the aerial parts (leaves and flowers) of *P. coronopifolia* against HeLa (human cervix carcinoma) and C6 (rat brain tumor) cells was tested using xCELLigence RTCA instrument. As shown in Figures 3 and 4, the extract exhibited different profiles on different concentrations. It has the most activity with the concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$ and it was about to reach to medium after 48 h post-treatment, while other concentrations [100 and 50 $\mu\text{g/mL}$] showed very low activity, nearly same with control. The profiles also showed differences at different time points. Low concentrations showed some activity against HeLa cells at 15th h (Figure 3) and against C6 cells at 3th h (Figure 4) after post-treatment, but after few hours they lost their capacity of inhibition. This may be caused because of the low ratio of bioactive molecules in the extract and within the time, cells started to proliferate after a short time of inhibition.

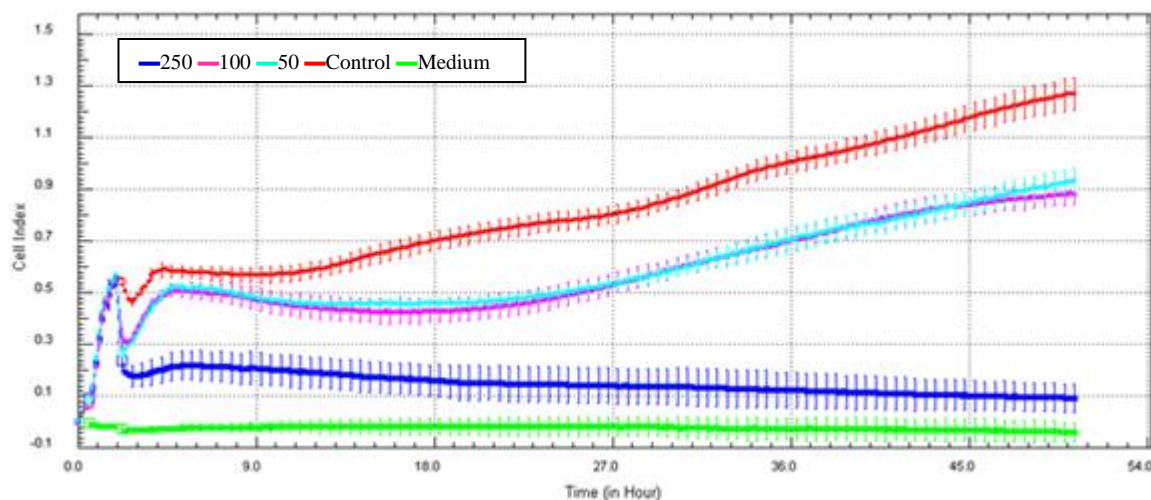


Figure 3. Anticancer activity of the ethyl acetate extract of *P. coronopifolia* against HeLa (2.5×10^4 cell/well) cell line. Each substance was tested twice in triplicates against cell lines using xCELLigence RTCA instrument. As seen in the diagram, several extract concentrations were applied to the cells and each color represents a different concentration.

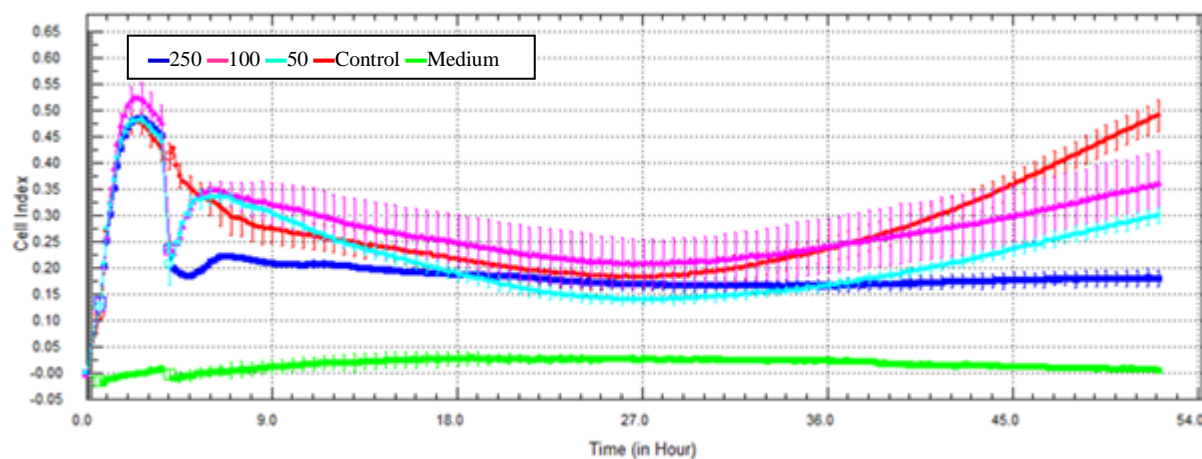


Figure 4. Anticancer activity of the ethyl acetate extract against C6 (2.5×10^4 cell/well) cell line. Each sample was tested twice in triplicates against cell lines using xCELLigence RTCA instrument. As seen in the diagram, several extract concentrations were applied to the cells and each color represent a different concentration.

3.2.3. Cell proliferation assay

The antiproliferative activities of samples and standard compound were determined against C6 and HeLa cell lines using BrdU cell proliferation ELISA assay [30, 31]. 5-FU was used as positive control. The antiproliferative activity of samples and positive control were investigated on eight concentrations (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 and 100 $\mu\text{g/mL}$). IC_{50} and IC_{75} values of the extracts and 5-FU were identified using ED₅₀ plus v1.0 programs (Table 1).

3.2.3.1. Antiproliferative activity of samples against HeLa cell.

The antiproliferative activity of the ethyl acetate extract was determined against HeLa cell. This extract has shown to increase the activity depending to the dose (Figure 5). The obtained results indicated

that the lower concentrations (5 and 10 µg/mL) showed the proliferative activity and the higher concentrations (50, 75 and 100 µg/mL) showed high antiproliferative activity against HeLa cells compared to 5-FU.

The potency of inhibition at 100 µg/mL was: 5-FU > EtOAc extract.

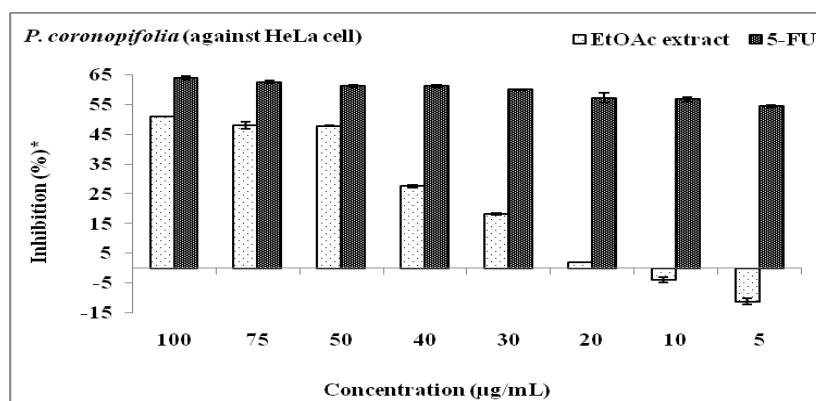


Figure 5. Antiproliferative activity of the EtOAc extract and 5-FU against HeLa cell line. Each sample was tested twice in triplicates against HeLa cell lines. Data showed average of 2 individual experiments ($p < 0.01$).

3.2.3.2. Antiproliferative activity of sample against C6 cell.

The antiproliferative activity of the ethyl acetate extract of *P. coronopifolia* was determined against C6 cell. The extract has shown to increase the activity as dose dependent manner. However, it was observed to have higher antiproliferative activity than 5-FU at 40-75 µg/mL (Figure 6).

The results of the present work are in agreement with previous evidences, which suggested that plant extracts are likely sources of substances potentially useful for the development of new drugs [32].

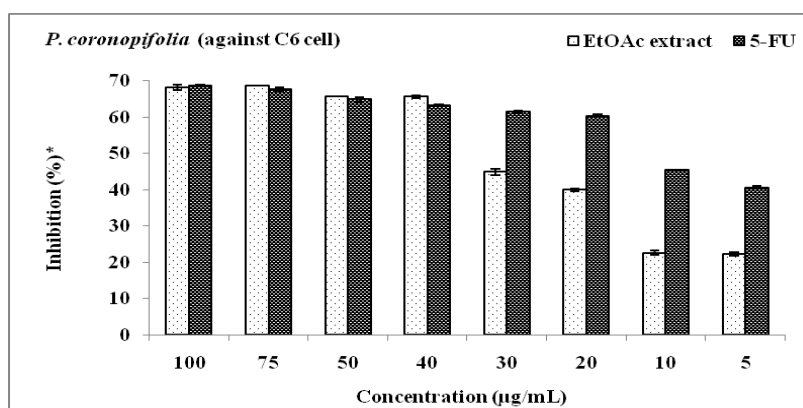


Figure 6. Antiproliferative activity of the EtOAc extract and 5-FU against C6 cell line. Each substance was tested twice in triplicates against cell lines. Data showed average of 2 individual experiments ($p < 0.01$).

As shown in Figures 5 and 6, there is no proliferative activity even in lower concentrations against C6 cell lines as seen in lower concentrations against HeLa cell lines. The highest activities were observed against C6 cell lines than 5-FU in high concentrations, but not the same observations were obtained against HeLa cell lines.

The antiproliferative activity of ethyl acetate extract is expressed in terms of IC₅₀ and IC₇₅ and given in Table 1. The comparison of the IC₅₀ and IC₇₅ values for the two cell lines used in this study indicated that the extract showed a higher activity against C6 cell lines than HeLa cell lines.

Table 1. IC₅₀ and IC₇₅ values of EtOAc extract of *P. coronopifolia* and 5-FU, presented by antiproliferative assay against HeLa and C6 Cell Lines.

	HeLa cell		C6 cell	
	IC ₅₀	IC ₇₅	IC ₅₀	IC ₇₅
EtOAc extract	45.49	63.71	11.81	44.64
5-FU	*	*	*	12.03

*<5 µg/mL.

3.2.4. Lactate Dehydrogenase (LDH) leakage assay

Cytotoxicity % = 0% No cytotoxic effect was observed

Lactate dehydrogenase (LDH) is a stable cytoplasmic enzyme present in all cells. It is rapidly released into the cell culture supernatant or blood when the plasma membrane of cells is damaged. For this reason, the LDH assay is a widely used quantitative test for the toxicity of various molecules and drugs cells [33]. As shown in Table 2, the present study demonstrated that the EtOAc extract of *P. coronopifolia* has no cytotoxic effect.

Table 2. The percentage of cytotoxicity (Cytotoxicity %) of EtOAc extract of *P. coronopifolia* and 5-FU against C6 Cell Line using Lactate Dehydrogenase (LDH) leakage assay.

Sample Name	Cytotoxicity (%)
EtOAc extract	0
5-FU	19

In conclusion, this study showed that, the ethyl acetate soluble part of *P. coronopifolia* aqueous-EtOH extract had an antioxidant activity. This activity is possibly due to the flavonoids chrysofenol D, taxifolin and caffeoylquinic acid derivatives which are the major components of this extract. A preliminary evaluation of the antiproliferative activity of this extract against HeLa and C6 cells revealed that it is quite promising for the cancer cells studied. They were tested by xCELLigence RTCA instrument and BrdU cell proliferation ELISA assay, respectively. 5-Fluorouracil was used as positive control. No cytotoxic effect was observed in this extract.

The relatively high content of bioactive compounds, positive antioxidant and antiproliferative properties of *P. coronopifolia* may justify the use of this plant as a new source of valuable antioxidants. *In vivo* studies are needed to confirm this pharmacological efficacy.

References

- [1] P. Eldenäs (1990). The genus *Perralderia* Cosson (Asteraceae-Inuleae-Inulinae), *Botanical Journal of The Linnean Society* **102**, 157–173.
- [2] P. Quezel and S. Santa. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du C.N.R.S, Paris. 1963, Tome **II** p. 941-942.
- [3] S. Benyahia, S. Benayache, F. Benayache, J. Quintana, M. Lopez, F. Leon, J. C. Hernandez, F. Estevez and J. Bermejo (2004). Isolation from *Eucalyptus occidentalis* and identification of a new kaempferol derivative that induce apoptosis in human myeloid leukemia cells, *J. Nat. Prod.* **67(4)**, 527-531.

- [4] A. Bentamène, J. Creche, G. Petit, J. Bermejo-Barrera, S. Benayache and F. Benayache (2005). A new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L. (Compositae), *Biochem. Syst. Ecol.* **33**, 1061-1065.
- [5] L. Zaiter, M. Bouheroum, S. Benayache, F. Benayache, F. León, I. Brouard, J. Quintana, F. Estévez and J. Bermejo (2007). Sesquiterpene lactones and other constituents from *Matricaria chamomilla*, *Biochem. Syst. Ecol.* **35**, 533-538.
- [6] A. Boudjerda, H. Zater, S. Benayache, J. C. Chalchat, J. González-Platas, F. León, I. Brouard, J. Bermejo and F. Benayache (2008). A new guaianolide and other constituents from *Achillea ligustica*, *Biochem. Syst. Ecol.* **36**, 461- 466.
- [7] R. Seghiri, O. Boumaza, R. Mekkiou, S. Benayache, P. Mosset, J. Quintana, F. Estévez, F. León, J. Bermejo and F. Benayache (2009). A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*, *Phytochem. Lett.* **2**, 114-118.
- [8] L. Hammoud, R. Seghiri, S. Benayache, P. Mosset, A. Lobstein, M. Chaabi, F. León, I. Brouard, J. Bermejo and F. Benayache (2012). A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M., *Nat. Prod. Res.* **26**, 203-208.
- [9] E. H. Kolli, F. León, F. Benayache, S. Estévez, J. Quintana, F. Estévez, I. Brouard, J. Bermejo and S. Benayache (2012). Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents from *Centaurea omphalotricha*, *J. Braz. Chem. Soc.* **23(5)**, 977-983.
- [10] S. Bicha, P. Chalard, L. Hammoud, F. León, I. Brouard, V. P. Garcia, A. Lobstein, A. Bentamene, S. Benayache, J. Bermejo and F. Benayache (2013). Maroccanin: a new γ -lactone and other constituents from *Centaurea maroccana* Ball. (Asteraceae), *Rec. Nat. Prod.* **7(2)**, 114-118.
- [11] O. Barberá, J. F. Sanz, J. S. Parareda and J. A. Marco (1986). Further flavonol glycosides from *Anthyllis onobrychioides*, *Phytochemistry* **25**, 2361-2365.
- [12] A. Rustaiyan, Z. Habibi and C. Zdero (1990). Clerodane derivatives from *Platychaete aucheri*, *Phytochemistry* **29**, 985-987.
- [13] T. J. Ling , W. W. Ling , Y. J. Chen, X. C. Wan, T. Xia, X. F. Du and Z. Z. Zhang (2010). Antiseptic activity and phenolic constituents of the aerial parts of *Vitex negundo* var. *cannabifolia*, *Molecules* **15**, 8469-8477.
- [14] J. A. Marco, O. Barberá , S. Rodríguez, C. Domingo and J. Adell (1988). Flavonoids and other phenolics from *Artemisia hispanica*, *Phytochemistry* **27**, 3155-3159.
- [15] A. Sakushima, M. Cokun, S. Hisada and S. Nishibe (1983). Flavonoids from *Rhamnus pallasii*, *Phytochemistry* **22 (7)**, 1677-1678.
- [16] Y. Chuda , H. Ono, K. M. Ohnishi, T. Nagata and T. Tsushida (1996). Structural identification of two antioxidant quinic acid derivates from garland (*Chrysanthemum coronarium* L.), *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2037-2039.
- [17] H. C. Kwon, C. M. Jung , C. G. Shin, J. K. Lee, S. U. Choi, S. I. Kim and K. R. Lee (2000). A new caffeoyl quinic acid from *Aster scaber* its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase, *Chem. Pharm. Bull.* **48**, 1976-1978.
- [18] P. Basnet, K. Matsushige, K. Hase, S. Kadota and T. Namba (1996). Four di-*O*-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models , *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1479-1484.
- [19] M. Yoshikawa, H. Shimada, S. Horikawa, T. Murakami, H. Shimoda, J. Yamahara and H. Matsuda (1997). Bioactive constituents of Chinese natural medicines. IV¹⁾. *Rhodiola* Radix. (2): On the histamine release inhibitors from the underground part of *Rhodiola sacra* (Prain ex Hamet) S. H. Fu (Crassulaceae): Chemical structures of rhodiocyanoside D and sacranosides A and B, *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1498-1503.
- [20] S. Nakamura, X. Li, H. Matsuda, K. Ninomiya, T. Morikawa, K. Yamaguti and M. Yoshikawa (2007). Bioactive constituents from Chinese Natural medicines. XXVI.¹⁾ Chemical structures and hepatoprotective effects of constituents from roots of *Rhodiola sachalinensis*, *Chem. Pharm. Bull.* **55(10)**, 1505-1511.
- [21] A. Carnat, A. Heitz, D. Fraisse, A. P. Carnat and J. L. Lamaison (2000). Major dicaffeoylquinic acids from *Artemisia vulgaris*, *Fitoterapia* **71**, 587- 589.
- [22] S. Singh, C. M. Maynard, R. J. Doyle and K. G. Taylor (1984). Sucrose chemistry. A synthetically useful monoarenesulfonation, *J. Org. Chem.* **49**, 976-981.
- [23] H. Otsuka, H. Kuwabara and H. Hoshiyama (2008). Identification of sucrose diesters of aryldihydronaphthalene-type lignans from *Trigonotis peduncularis* and the nature of their fluorescence, *J. Nat. Prod.* **71**, 1178-1181.
- [24] A. Braca, N. De Tommasi, L. Di Bari, C. Pizza, M. Politi and I. Morelli (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*, *J. Nat. Prod.* **64(7)**, 892-895.
- [25] M. Majewska, M. Skrzycki, M. Podsiad and H. Czacot (2011). Evaluation of antioxidant potential of

- flavonoids: An *in vitro* study, *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* **68(4)**, 611-615.
- [26] Y. Wei, X. Chen, X. Jiang, Z. Ma and J. Xiao (2009). Determination of taxifolin in *Polygonum orientale* and study on its antioxidant activity, *J. Food Comp. Anal.* **22(2)**, 154-157.
- [27] N. D. Martini, D. R. P. Katerere and J. N. Eloff (2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae), *J. Ethnopharmacol.* **93**, 207-212.
- [28] T. M. Hung, M. Na, P. T. Thuong, N. D. Su, D. Sok, K. S. Song, Y. H. Seong and K. Bae (2006). Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall., *J. Ethnopharmacol.* **108(2)**, 188-92.
- [29] A. S. Yaglioglu, B. Akdulum, R. Erenler, I. Demirtas, I. Telci and S. Tekin (2013). Antiproliferative activity of pentadeca-(8E, 13Z) dien-11-yn-2-one and (E)-1, 8-pentadecadiene from *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. roots, *Med. Chem. Res.* **22(6)**, 2946-2953.
- [30] I. Demirtas, A. Sahin, B. Ayhan, S. Tekin and I. Telci (2009). Antiproliferative effects of the methanolic extracts of *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis*, *Rec. Nat. Prod.* **3(2)**, 104-109.
- [31] I. Demirtas, I. H. Gecibesler and A. S. Yaglioglu (2013). Antiproliferative activities of isolated flavone glycosides and fatty acids from *Stachys byzantine*, *Phytochem. Lett.* **6**, 209-214.
- [32] A. Salatino, M. L. F. Salatino and G. Negri (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae), *J. Braz. Chem. Soc.* **18**, 11-33.
- [33] K. H. Kumar, S. Razack, I. Nallamuthu and F. Khanum (2014). Phytochemical analysis and biological properties of *Cyperus rotundus* L., *Ind. Crop. Prod.* **52**, 815-826.

ACG
publications

© 2015 ACG Publications



T.C.
ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

01/04/2014

To Mr. the Dean of the Faculty of Biology at the University of Constantine 1

I am Prof. Dr. Ibrahim Demirtas testify that Khadidja Bekhouche Eps Medridj has been applied in Plant Research Laboratory for a period of tow months starting from the 20/10/2013 to 25/12/2013 has worked on several separate pure compounds from the plants *Giallonia.sp*, *Perralderia.sp*, *Hedysurum.sp* and *Verbascum.sp*. Use the anti-cancer, proliferative and cytotoxicity activities by xCELLigence and ELISA systems. Important constituents were characterized from the fatty acids and pure phenolic in these plants extracts using GC-MS and HPLC-TOF/MS analysis.

She has done a lot of work and indeed is an excellent and hard-working student. She had a very good progress in her part time PhD work and did many activities.

Sincerely,

Prof. Dr. Ibrahim Demirtas

Plant Research Laboratory

Department of Chemistry

Faculty of Science

Cankiri Karatekin University

Adres: Çankırı Karatekin Üniversitesi II No'lu kampusu A. Halik Renda Mahallesi Ankara Caddesi Ballica mevkii ÇANKIRI
Ayrıntılı bilgi için irtibat : Telefon : 0 (376) 218 11 23, Fax: 0 (376) 218 10 31
E-posta : fenfd@karatekin.edu.tr :Elektronik web: www.karatekin.edu.tr



T.C.

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

19/05/2015

To Mr. the Dean of the Faculty of Biology at the University of Constantine 1

I am Prof. Dr. İbrahim Demirtaş testify that Khadidja Bekhouche has been applied in Plant Research Laboratory for a period of two months starting from the 19-03-2015 to 19-05-2015 has worked on several separate pure compounds from the plants *Giallonia.sp* and *Perralderia.sp*. Use the anti-cancer and proleferative activities by xCELLigence and ELISA systems and the in vivo antioxidant activity using rats. Important constituents were characterized from the fatty acids and pure phenolic in these plants extracts using GC-MS and HPLC-TOF/MS analysis.

She has done a lot of work and indeed as an excellent and hard-working student. She had a very good progress in her part time PhD work and did many activities.

Sincerely,

Prof. Dr. İbrahim Demirtaş

Plant Research Laboratory

Department of Chemistry

Faculty of Science

Çankırı Karatekin University

Adres: Çankırı Karatekin Üniversitesi Uluyazı Kampusu Araştırma Laboratuvarı, ÇANKIRI
Ayrıntılı bilgi için irtibat : Telefon : 0 (376) 218 95 38 Fax: 0 (376) 218 10 31
E-posta : Elektronik Ağ: www.karatekin.edu.tr

Année universitaire : 2018-2019

Présentée par : BEKHOUCHE Khadidja

L'effet protecteur des extraits des plantes (*Perralderia coronopifolia* et *Gaillonia reboudiana*) vis-à-vis d'une toxicité provoquée par le pentachlorophénol.

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat

Cette étude a été réalisée afin d'évaluer les effets protecteurs et les propriétés biologiques des deux plantes endémiques, *P. coronopifolia* et *G. reboudiana*. Les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de la plante *P. coronopifolia* ainsi que l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* montrent une richesse en composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes. Ces composés ont fourni un pouvoir antioxydant très important par rapport aux standards antioxydants. Ce pouvoir est justifié *in vitro* par la puissance réductrice et la grande capacité de piégeage des EROs, de chélation des métaux, d'inhibition de la peroxydation lipidique, de la protection d'ADN plasmidique contre les dommages oxydatifs induits par les EROs. Ainsi, une activité antiproliférative puissante de concentration plus élevée a été prouvée chez ces différents extraits contre les lignes cellulaires cancéreuses C6 et HeLa.

De plus, plusieurs méthodes complaisantes le pouvoir antioxydant ont été effectuées. Ces méthodes ont prouvé l'effet antioxydant *in vivo* et l'effet protecteur de ces extraits contre les altérations fonctionnelles et structurelles au niveau des foies, rein et cœur suite à une toxicité induite par le PCP (pendant deux semaines avec une dose de 20 mg/kg), chez des rattes adultes. Ces extraits agissent sur le maintien du système antioxydant contre les xénobiotiques.

Le PCP a causé des lésions du système électrique dans les membranes cellulaires via une augmentation significative du MDA, une diminution de l'activité de GPx, une diminution du taux de GSH et une importante perturbation des paramètres biochimiques sériques (une augmentation des concentrations d'AST, d'ALT, de bilirubines totaux, d'urée, de créatine, de cholestérol et de triglycérides).

Le prétraitement des rats avec l'extrait *n*-butanol de la plante *P. coronopifolia* et l'extrait méthanolique de la plante *G. reboudiana* montre qu'ils sont capables de normaliser le taux du MDA, du glutathion réduit, de l'activité de GPx dans les homogénats (des foies, des reins et des cœurs) et de normaliser les paramètres biochimiques dans les sérums des rattes traitées par le PCP. Le prétraitement avec ces extraits a montré qu'ils peuvent agir comme des terminateurs de chaîne radicalaire qui convertit les radicaux libres réactifs en produits stables et non réactifs, et aussi comme des chémo-protecteurs contre les dommages oxydatifs cellulaires induits suite à une ingestion du PCP.

Une étude histologique a été réalisée afin de confirmer leurs effets protecteurs contre la toxicité induite par le PCP, en protégeant l'architecture hépatique, rénale et cardiaque et en diminuant les altérations fonctionnelles et structurelles de ces organes.

Ces extraits ont bien montré des effets antioxydants, protecteurs d'ADN, des chémo-protecteurs, anticancéreux à des concentrations élevées, et des hépto-protecteurs contre la toxicité induite par le PCP chez des rats Wistar Albino.

Mots clés : *Perralderia coronopifolia* ; *Gaillonia reboudiana* ; Pentachlorophénol ; Polyphénols ; Activité antioxydante ; Activité anticancéreuse ; Hépto-toxicité.

Laboratoire de recherche : laboratoire de physiologie animal. Département de biologie animale. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Frères Mentouri 1 Constantine, Algérie.