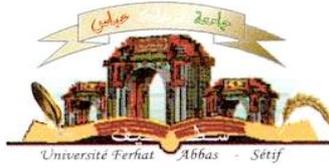


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2017

## THÈSE

Présentée par

**MESSAOUDI Dalila**

Pour l'obtention du diplôme de

## DOCTORAT EN SCIENCES

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: BIOCHIMIE**

### THÈME

**Effet hépatoprotecteur et propriétés antioxydantes de *Santolina chamaecyparissus***

Soutenue publiquement le 27/04/2017

#### DEVANT LE JURY

Président	<b>Houcher Bakhouché</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Directeur	<b>Bouriche Hamama</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Co-directeur	<b>Senator Abderrahmane</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Examineurs	<b>Amedah Souad</b>	<b>Pr. UMC Constantine 1</b>
	<b>Khettal Bachra</b>	<b>Pr. UAM Bejaia</b>
	<b>Lalaoui Koraichi</b>	<b>Pr. UMC Constantine 1</b>

*Laboratoire de Biochimie Appliquée*

## *Remerciements*

*C'est avant tout grâce à Allah que ce travail a pu être réalisé.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse  
Professeur Hamama Bouriche. Je la remercie pour sa disponibilité et son suivi tout au  
long de mes années de recherche qui ont permis de mener à terme ce travail. Je la remercie  
beaucoup d'avoir consacré du temps à la lecture et à la correction de ce document. Je lui assure  
le témoignage de ma profonde reconnaissance  
Merci madame.*

*J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Abderrahmane Sénator qui par ses  
conseils et ses critiques a guidé mes réflexions durant mes recherches. Je vous remercie encore  
d'avoir consacré un temps énorme à la correction de cette thèse.*

*Je tiens à remercier Professeur Houcher Bakhouche d'avoir accepté d'être président du  
jury. Je tiens à exprimer également ma gratitude aux membres du jury : Pr Lalaoui, Pr  
Amedah et Pr Khettal d'avoir accepté de juger mon travail.*

*Un grand merci pour le chef du laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Sétif  
Dr Abdellouche D. ainsi que tout son équipe spécialement M<sup>me</sup> Boulahia Dalila et Dr  
Hammoudi Khalida.*

*D'autre part, je tiens à exprimer mes sincères remerciements à : Pr Zainul amiruddin  
zakaria (Malaisie), Pr Ibrahim demirtas, (Turquie), Pr Murat Kizil (Turquie)  
et Pr Areej Assaf (Jordanie)*

*A tous ces intervenants, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à:*

*Ma mère, pour son amour, sa gentillesse et sa tendresse, pour son sacrifice qu'elle n'a cessé de faire tout au long de ma formation et surtout pour ses prières.*

*Mon père, j'espère que tu trouveras dans ce travail toute la fierté que peut éprouver un père pour sa fille.*

*Ma belle mère, merci d'être à côté de mon père et merci pour tes prières pour moi*

*Mon frère unique Fatch, sa femme et leurs enfants : Malak hibet errahmene,  
Adem et Mohammed Ishaq*

*Mon amie intime Sarah Roumili, merci d'être toujours à côté de moi*

*Mes ami(e)s & membres de laboratoire : Hassiba Benabdellah, Secoussen Kada, Nassima Karouf, Hichem Meziti, Asma Meziti, Oualid Mamache, Thoraya Guemmaz, Wided Sobhi et Asma Mosbah et Chahra Boudoukha*

*Mes ami(e)s de ma promo de magister (2002) avec qui je suis toujours en contact  
Abdelali Boussif, Kacouhar boudiaf, Zahira houcher, Amel belambri,  
Hanene boukemara et Yacine Derradji.*

*Dalila*

## ملخص

تم في هذه الدراسة، تقييم الفعل الوقائي للكبد للمستخلصين الإيثانولي و المائي لنبته *Santolina chamaecyparissus* عند الجرذان المسممة بالباراسيتامول و رباعي كلوريد الكربون  $CCl_4$ . بينت النتائج أن هذين المركبين يحفزان السمية بشكل ملحوظ، غير أن المعاملة الوقائية بالمستخلصين يقي الكبد من مخاطر السمية. فعند التركيز 150 مغ/كلغ يخفض كل من المستخلصان الإيثانولي أو المائي بصورة معتبرة احصائيا نشاط انزيم ALT بنسبة 58% و 80.5%، AST 70.5% و 66%، MDA 49.6% و 46.6%، LDH 76.7% و 69.2%، و يحافظان على نشاط انزيم SOD بـ 68.8% و 88.9% و ذلك في كل من نموذجي  $CCl_4$  و البراسيتامول على الترتيب. كما بينت الدراسة النسيجية أن كلا المستخلصين يقيان ضد النخر الكبدي و التشحم. وكان هذا الفعل الوقائي متشابها مع ذلك المتحصل عليه بـ 100 مغ/كلغ من السيليمارين المستعمل كمرجع. كما بينت النتائج أن المستخلصين يملكان نشاطا مضادا للأكسدة جيني، حيث تبين أن لهما القدرة على التقاط جذور DPPH، ارجاع و استخلاص أيونات الحديد و ذلك بـ  $IC_{50}$  مساوية لـ 38 ميكروغرام/مل، 270 ميكروغرام/مل و 53 ميكروغرام/مل. إضافة إلى ذلك فإنهما يقيان كل من  $\beta$ -carotène، ADN و البروتين من الأكسدة بـ 77%، 52 - 93% و 59-92% على الترتيب. تم أيضا تقييم الفعل المضاد للإلتهاب لكلا المستخلصين حيويا و في الزجاج. و بينت النتائج أن كلا المستخلصين يشبطان بنسبة 36% و ذمة الأذن المحفزة بزيت كروتون و يشبطان هجرة الخلايا البيضاء بـ 39%. كما أن معالجة الخلايا وحيدات النوى بـ 1 و 10 ميكروغرام/مل بالمستخلص المائي أو الإيثانولي خفضت من تركيز  $IL-1\beta$ ،  $TNF\alpha$  و  $IL-8$  بـ 60%، 16% و 43% على التوالي. في حين أن  $IL-10$  لم تتأثر. علاوة على ذلك أظهر المستخلصان عند التركيز 1 مغ/مل فعلا وقائيا ضد تحلل أغشية كريات الدم الحمراء. يمكن إرجاع الفعل الوقائي للكبد لكلا المستخلصين إلى نشاطهما المضاد للأكسدة و الإلتهاب اللذان يعودان إلى محتواهما من المركبات النشطة حيويا. و بالفعل بينت التحاليل الكيميائية أن كلا المستخلصين غنيين بالفلافونويدات و عدد بحبات الفينول. يمكن إستغلال نبته *Santolina chamaecyparissus* كمصدر غني بالمركبات النشطة حيويا لاكتشاف أدوية جديدة طبيعية لعلاج الإصابات الكبدية .

**الكلمات الدالة:** حماية الكبد، مضاد الأكسدة، مضاد الإلتهاب، *Santolina chamaecyparissus*، عديدات الفينول، الفلافونويدات، البراسيتامول، رباعي كلوريد الكربون

## Résumé

Dans la présente étude, l'effet hépatoprotecteur des extraits éthanolique (EE) et aqueux (EA) de *Santolina chamaecyparissus* est évalué chez les rats intoxiqués par le paracétamol et le CCl<sub>4</sub>. Les résultats montrent que ces agents induisent une hépatotoxicité remarquable. Cependant, le traitement par l'EE ou l'EA, avant l'induction de l'hépatotoxicité, protège le foie. A 150 mg/Kg, l'EE ou l'EA diminuent significativement le taux d'ALT de 58% et 80.5%, d'AST de 70.5% et 66%, de MDA de 49.6% et 46.6%, de LDH de 76.7% et 69.2%, comme ils rétablissent l'activité de la SOD de 68.8% et 88.9% dans le modèle de CCl<sub>4</sub> et de paracétamol respectivement. L'examen histologique a révélé que les deux extraits protègent le foie contre la nécrose et la stéatose. L'effet hépatoprotecteur des deux extraits était proche de celui du silymarin 100 mg/Kg, utilisé comme référence. D'autre part, les résultats montrent que les deux extraits sont doués d'activité anti-oxydante très importante. En effet, ces extraits scavengent les radicaux de DPPH, réduisent et chélatent le fer ferreux avec des IC<sub>50</sub> de 38 µg/ml, 270 µg/ml et 53 µg/ml respectivement. En plus, ils réduisent le blanchissement de la β-carotène avec 77%, l'oxydation de l'ADN avec 52% - 93% et l'oxydation de protéine avec 59% - 92%. L'activité anti-inflammatoire d'EA et d'EE est également évaluée *in vivo* et *in vitro*. Les résultats montrent que les deux extraits sont capables de réduire l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton avec 36% et inhibent la migration des leucocytes avec 39%. Le prétraitement des leucocytes mononucléaires avec 1 et 10 µg/ml d'EA ou d'EE diminue le taux d'IL-1β, de TNFα et d'IL-8 par 60%, 16% et 43% respectivement, tandis que le taux de l'IL-10 n'est pas altéré. En outre, à 1 mg/ml, les deux extraits protègent les hématies contre l'hémolyse avec 55%. Globalement, l'effet hépatoprotecteur de ces extraits pourrait être attribué à leurs activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires exercées par leurs composés bioactifs. En effet, l'analyse phytochimique a révélé que ces extraits sont riches en polyphénols et en flavonoïdes. Ainsi, la plante *Santolina chamaecyparissus* pourrait être exploitée comme une source potentielle de composés bioactifs pour développer de nouveaux médicaments naturels pour traiter certains désordres hépatiques.

**Mots clés :** hépatoprotection, anti-oxydant, anti-inflammatoire, *Santolina chamaecyparissus*, polyphénols, flavonoïdes, paracétamol, tétrachlorure de carbone.

## Abstract

In the present study, the hepatoprotective effect of ethanol (EE) and aqueous extracts (EA) of *Santolina chamaecyparissus* was evaluated in rats intoxicated by paracetamol and CCl<sub>4</sub>. Results showed that these agents induced remarkable hepatotoxicity. However, the treatment with EE or EA, prior to the induction of hepatotoxicity, protected the liver from damage. At 150 mg/Kg, both extracts significantly reduced ALT by 58% and 80.5%, AST by 70.5% and 66%, MDA by 49.6% and 46.6%, LDH by 76.7% and 69.2%, as they restore SOD activity by 68.8%, 88.9% in CCl<sub>4</sub> and paracetamol models, respectively. The histological examination revealed that both extracts protect against hepatic necrosis and steatosis. The hepatoprotective effect of both extracts was similar to that of 100 mg/kg of silymarin, used as a reference. On the other hand, results showed that the two extracts exhibit very important antioxidant activity. Indeed, these extracts scavenged DPPH radicals, reduce and chelate ferrous ions with IC<sub>50</sub> of 38 µg/ml, 270 µg/ml and 53 µg/ml, respectively. Moreover, they reduce β-carotene bleaching with 77%, oxidation of DNA with 52% - 93% and protein oxidation with 59% - 92%. In addition, the anti-inflammatory activity of EA and EE is evaluated *in vivo* and *in vitro*. Results show that both extracts are able to reduce croton oil-induced ear edema with 36% and inhibit leukocyte migration with 39%. The pretreatment of mononuclear leukocytes with 1 and 10 µg/ml of EA or EE decreased the production of IL-1β, TNFα and IL-8 by 60%, 16% and 43%, respectively, while the IL-10 was not altered. Moreover, at 1 mg/ml, both extracts protect the erythrocytes against hemolysis by 55%. Taken together, the hepatoprotective effect of these extracts could be attributed to their antioxidant and anti-inflammatory activities exerted by their bioactive compounds. Indeed, phytochemical analysis revealed that these extracts are rich in polyphenols and flavonoids. Thus, the plant *Santolina chamaecyparissus* could be exploited as a potential source of bioactive compounds to develop new natural medicines to treat liver disorders.

**Key words :** hepatoprotection, anti-oxidant, anti-inflammatory, *Santolina chamaecyparissus*, polyphenols, flavonoids, paracetamol, carbon tetrachloride.

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Structure d'un lobule hépatique .....	4
<b>Figure 2.</b> Métabolisme de la bilirubine.....	9
<b>Figure 3.</b> Mécanisme d'induction du stress oxydant et de lésions hépatiques par le paracétamol .....	16
<b>Figure 4.</b> Structure chimique du paracétamol.....	18
<b>Figure 5.</b> Photographie de <i>Santolina chamaecyparissus</i> .....	22
<b>Figure 6.</b> A: Droite d'étalonnage de l'acide gallique. B: Droite d'étalonnage de la quercétine .....	28
<b>Figure 7.</b> Technique d'isolement des leucocytes monocléaires périphériques (PBMC).....	37
<b>Figure 8.</b> Chromatogramme de l'HPLC-TOF/MS de l'extrait aqueux (A) et de l'extrait éthanolique (B) de <i>Santolina chamaecyparissus</i> .....	41
<b>Figure 9.</b> Effet des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> sur le taux sériques de l'ALT (A), et l'AST(B).....	44
<b>Figure 10.</b> Effet des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> sur le taux sériques de la PAL (A) et de la LDH (B) .....	46
<b>Figure 11.</b> Effet des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> sur le taux du cholestérol (A) et de triglycérides (B).....	49
<b>Figure 12.</b> Effet des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> sur le taux d'urée (A) et de créatinine (B).....	51
<b>Figure 13.</b> Coupes histologiques du foie (x 100) des rats traités par le CCl <sub>4</sub> .....	54
<b>Figure 14.</b> Coupes histologiques du foie (x 100) des rats traités par le paracétamol.....	55
<b>Figure 15.</b> Activités anti-oxydantes des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> . .....	57
<b>Figure 16.</b> Activité protectrice des extraits aqueux et éthanolique de <i>S. chamaecyparissus</i> contre la dénaturation de l'ADN .....	59
<b>Figure 17.</b> Activité protectrice des extraits aqueux et éthanolique de <i>S. chamaecyparissus</i> contre la l'oxydation de la BSA. ....	61
<b>Figure 18.</b> Effet des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. ....	62
<b>Figure 19.</b> Effet de l'extrait aqueux (EA) et de l'extrait éthanolique (EE) de <i>S.</i> <i>chamaecyparissus</i> sur l'infiltration des leucocytes vers la poche d'air .....	62
<b>Figure 20.</b> Effet de l'extrait aqueux (EA) et de l'extrait éthanolique (EE) de <i>S.</i> <i>chamaecyparissus</i> sur la production des cytokines.....	64

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Principaux mécanismes des lésions hépatiques induites par les médicaments .....	11
<b>Tableau 2.</b> Classification des hépatites aiguës .....	12
<b>Tableau 3.</b> Protocole d'induction de l'hépatotoxicité par le CCl <sub>4</sub> et le paracétamol .....	29
<b>Tableau 4.</b> Composés phénoliques identifiés par HPLC–TOF-MS dans l'extrait aqueux et éthanolique de <i>Santolina chamaecyparissus</i> .....	41
<b>Tableau 5.</b> Effet du CCl <sub>4</sub> et du paracétamol sur les paramètres biochimiques .....	43
<b>Tableau 6.</b> Effet des extraits aqueux (EA) et éthanolique (EE) de <i>S. chamaecyparissus</i> sur l'alanine aminotransférase (ALT), l'aspartate aminotransférase (AST) et la phosphatase alcaline (PAL) .....	43
<b>Tableau 7.</b> Effet des extraits de <i>Santolina chamaecyparissus</i> sur le taux sérique de la bilirubine totale, de l'albumine et des protéines totales .....	47
<b>Tableau 8.</b> Effet de l'extrait aqueux (EA) et éthanolique (EE) de <i>S. chamaecyparissus</i> sur le MDA, la catalase et la SOD du surnageant hépatique.....	53
<b>Tableau 9.</b> Effet protecteur de l'EA et l'EE contre l'hémolyse des hématies humaines induites par l'hypotonie du milieu .....	65

## Liste des abréviations

AIF	Facteur induisant l'apoptose
ALT	Alanine amino transférase
AST	Aspartate amino transférase
Bax	Bcl-2-associated X
BID	BH <sub>3</sub> interacting-domain death agonist
BHT	2,6 di-tert butyl-4-methylphenol
CCR	Récepteur de chimiokine C-C
CD	Classe de différenciation
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CXCL	Chémokine de type CXC
CYP	Cytochrome P
DAMPs	Molécules associées aux endommagements cellulaires
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl
EASC	Extrait aqueux de Santolina chamaecyparissus
EDTA	Acide ethylenediamine tétraacétique
EESC	Extrait éthanolique de Santolina chamaecyparissus
ERN	Espèces réactives azotées
ERO	Espèces réactives oxygénées
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
GdCl <sub>3</sub>	chlorure de gadolinium
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HPLC-TOF/MS	High performance liquid chromatography Time of flight/mass spectrometry
HSP	Protéines du choc thermique
IFN $\gamma$	Interféron $\gamma$
IH	Insufisance hépatique
IL	Interleukines
ITIS	Système d'information taxonomique intégré
LDH	Lactate deshydrogénase
MCPI	Monocyte chemoattractant protein 1
MDA	Malondialdéhyde

NAPQI	N-acetyl p-benzoquinone imine
NCBI	Centre américain pour les informations biotechnologiques
NFκB	Facteur nucléaire κB
NH <sub>3</sub>	Ammoniac
NO	Monoxyde d'azote
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAF	Facteur activant les plaquettes
PAL	Phosphatase alcaline
PBMCs	Cellules mononucléaires périphériques
PCM	Paracétamol
SOD	Superoxyde dismutase
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TGFβ	Facteur de croissance transformant β
TLR	Toll like receptor
TNFα	Facteur necrosant des tumeursα
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>I. Le foie .....</b>	<b>3</b>
I.1. Anatomie et histologie du foie .....	3
I.2. Cellules du foie.....	3
I.2.1. Hépatocytes .....	3
I.2.2. Cellules sinusoidales endothéliales .....	5
I.2.2.1. Cellules stellaires .....	5
I.2.2.2. Cellules de Kuppfer .....	6
I.2.3. Cholangiocytes .....	6
I.3. Fonctions hépatiques .....	7
I.3.1. Production des sels biliaires .....	7
I.3.2. Production de la bile.....	7
I.3.3. Métabolisme des nutriments.....	8
I.3.4. Détoxification.....	8
I.3.5. Régénération.....	10
I.4. Atteintes hépatiques.....	10
I.4.1. Insuffisance hépatique .....	12
I.4.2. Encéphalopathie hépatique .....	13
I.4.3. Cholestase (Stase biliaire) .....	13
I.4.4. Stéatose.....	14
I.4.5. Cytolyse.....	15
I.4.6. Cirrhose .....	15
I.5. Relation entre stress oxydant, inflammation et maladies hépatiques .....	15
I.6. Hépatotoxines .....	17
I.6.1. Le paracétamol .....	18
I.6.2. Le tétrachlorure de carbone .....	19
I.7. Traitement des maladies hépatiques .....	20
I.7.1. Traitement classique.....	20
I.7.2. Traitement alterne.....	20
<b>II. <i>Santolina chamaecyparissus</i> .....</b>	<b>21</b>
II.1. Description et classification botanique .....	21
II.2. Utilisation traditionnelle.....	22
II.3. Composition chimique .....	22
II.4. Activités biologiques.....	23

**PARTIE EXPERIMENTALE****MATÉRIEL ET MÉTHODES**

I. Matériel .....	25
I.1. Réactifs .....	25
I.2. Matériel végétal .....	25
I.3. Animaux .....	25
II. Méthodes .....	26
II.1. Préparation des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> .....	26
II.2. Analyse phytochimique des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> .....	26
II.2.1. Dosage des polyphénols .....	26
II.2.2. Dosage des flavonoïdes .....	26
II.2.3. Détermination des composés phénoliques par HPLC/TOF-MS .....	27
II.3. Evaluation de toxicité des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> .....	27
II.4. Activité hépatoprotectrice des extraits <i>S. chamaecyparissus</i> .....	29
II.4.1. Induction de l'hépatotoxicité par le CCl <sub>4</sub> le paracétamol chez le rat .....	29
II.4.2. Analyses biochimiques .....	30
II.4.3. Dosage des catalase, SOD et MDA .....	30
II.4.3.1. Activité catalase .....	30
II.4.3.2. Activité SOD .....	30
II.4.3.3. Dosage du MDA .....	31
II.4.4. Etude histologique .....	31
II.5. Activités anti-oxydantes des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> .....	32
II.5.1. Test de DPPH .....	32
II.5.2. Test de blanchiment de β-carotène .....	32
II.5.3. Chélation du fer ferreux .....	33
II.5.4. Pouvoir réducteur .....	33
II.5.5. Test de scission des brins d'ADN .....	34
II.5.6. Test d'oxydation des protéines .....	34
II.6. Activités anti-inflammatoires des extraits <i>S. chamaecyparissus</i> .....	35
II.6.1. Activités anti inflammatoires <i>in vivo</i> .....	35
II.6.1.1. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton .....	35
II.6.1.2. Poche d'air .....	36
II.6.2. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	36
II.6.2.1. Effet des extraits <i>S. chamaecyparissus</i> sur la libération des cytokines .....	36
A/ Isolement des leucocytes mononucléaires .....	36
B/ Comptage et conservation des leucocytes mononucléaires .....	38
C/ Culture des leucocytes mononucléaires .....	38
D/ Dosage des cytokines libérées par les leucocytes mononucléaires .....	38

II.6.2.2. Activité antihémolytique des extraits <i>S. chamaecyparissus</i> .....	39
III. Analyses statistiques .....	39

## RÉSULTATS

1. Extraction .....	40
2. Analyse phytochimique .....	40
3. Toxicité des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> .....	40
4. Activité hépatoprotectrice de <i>S. chamaecyparissus</i> .....	42
4.1. Effet de <i>S. chamaecyparissus</i> sur les paramètres biochimiques .....	42
4.1.1. Effet sur les transaminases .....	42
4.1.2. Effet sur la phosphatase alcaline .....	45
4.1.3. Effet sur la lactate déshydrogénase .....	45
4.1.4. Effet sur la bilirubine totale .....	45
4.1.5. Effet sur le taux des protéines sériques .....	47
4.1.6. Effet sur le cholestérol et les triglycérides .....	47
4.1.7. Effet sur l'urée et la créatinine .....	48
4.2. Effet sur les paramètres antioxydants .....	50
4.2.1. Effet sur le MDA .....	50
4.2.2. Effet sur la catalase .....	52
4.2.3. Effet sur la SOD .....	52
4.3. Effet des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> sur l'histologie du foie .....	52
5. Activités anti-oxydantes des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> .....	56
5.1. Effet anti-radicalaire .....	56
5.2. Effet sur l'oxydation de la $\beta$ -carotène .....	56
5.3. Effet chélateur du fer ferreux .....	56
5.4. Pouvoir réducteur .....	58
5.5. Effet sur l'oxydation de l'ADN .....	58
5.6. Effet sur l'oxydation des protéines .....	60
6. Activités anti inflammatoires des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> .....	60
6.1. Activités anti inflammatoires <i>in vivo</i> .....	60
6.1.1. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton .....	60
6.1.2. Effet sur le recrutement des neutrophiles vers la poche d'air .....	60
6.2. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	63
6.2.1. Effet sur la libération des cytokines .....	63
A/ Effet sur le TNF- $\alpha$ .....	63
B/ Effet sur l'IL-1 $\beta$ .....	63
C/ Effet sur l'IL-10 .....	63
D/ Effet sur l'IL-8 .....	65
6.2.2. Effet stabilisant de la membrane plasmique .....	65

## DISCUSSION

1. Extraction et analyse phytochimique des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> .....	66
2. Activité hépatoprotectrice des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> .....	67
2.1. Effet des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> sur les paramètres biochimiques .....	68
2.2. Effet des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> sur les paramètres antioxydants .....	71
2.3. Effet des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> sur l'aspect histologique du foie .....	72
3. Activité anti-oxydante des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> .....	72
3.1. Activité anti radicalaire .....	73
3.2. Pouvoir réducteur .....	73
3.3. Effet chélateur du fer ferreux .....	74
3.4. Effet sur la peroxydation des lipides .....	74
3.5. Effet sur l'oxydation d'ADN .....	75
3.6. Effet sur l'oxydation de protéine .....	76
4. Activité anti-inflammatoire des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i> .....	77
4.1. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton .....	77
4.2. Effet sur le recrutement des neutrophiles .....	78
4.3. Effet sur la libération des cytokines .....	79
4.4. Effet sur la stabilité de la membrane plasmique .....	80
<b>Conclusion &amp; perspectives</b> .....	<b>82</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>83</b>

# Introduction

## Introduction

Le foie est un organe très important, impliqué dans plusieurs fonctions vitales. Il participe au processus de la digestion par la sécrétion biliaire et transforme l'apport discontinu des nutriments absorbés par le tube digestif en un flux continu de substances nutritives. Le foie est aussi responsable de l'élimination de certains déchets métaboliques comme l'ammoniac, la bilirubine et la plupart des xénobiotiques. De ce fait, le foie se trouve exposé à diverses agressions qui ont parfois de graves répercussions sur l'organisme à savoir l'hépatite, la cholestase, la cirrhose, la fibrose et la stéatose.

Le  $\text{CCl}_4$  est utilisé comme solvant ou comme réactif dans les laboratoires et les industries chimiques. Ce solvant peut manifester sa toxicité sur l'organisme en provoquant d'importantes lésions hépatiques. Il est métabolisé en radicaux libres ( $\text{CCl}_3$ ) qui réagissent avec les macromolécules cellulaires, protéines, ADN et lipides membranaires. Par conséquent, les attaques de ces radicaux provoquent une toxicité aiguë et chronique du foie, conduisant à une stéatose, une nécrose, une fibrose et une cirrhose.

Le paracétamol est le médicament antalgique le plus utilisé dans le monde par automédication. La consommation excessive du paracétamol conduit à plusieurs effets nocifs tels que la nécrose hépatique, la néphrotoxicité, voir même la mort. Le produit final (N-acétyl-p-benzoquinoneimine) issu du métabolisme du paracétamol au niveau du foie attaque les différentes biomolécules conduisant à une nécrose hépatique.

L'action des hépatotoxines peut également initier la réaction inflammatoire en activant les cellules de Kupffer comme première ligne de défense de l'organisme. Ces cellules produisent des médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines qui aggravent l'atteinte hépatique.

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

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

Le présent travail a été entrepris afin d'évaluer l'effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux et éthanolique de la partie aérienne de *Santolina chamaecyparissus*, une plante largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie.

Les objectifs de la présente étude sont :

- Analyse phytochimique des extraits éthanolique et aqueux de *Santolina chamaecyparissus*
- Etude de l'effet protecteur des deux extraits contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol et le CCl<sub>4</sub> chez le rat
- Evaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des deux extraits obtenus.

Etude

Bibliographique

# I. Le foie

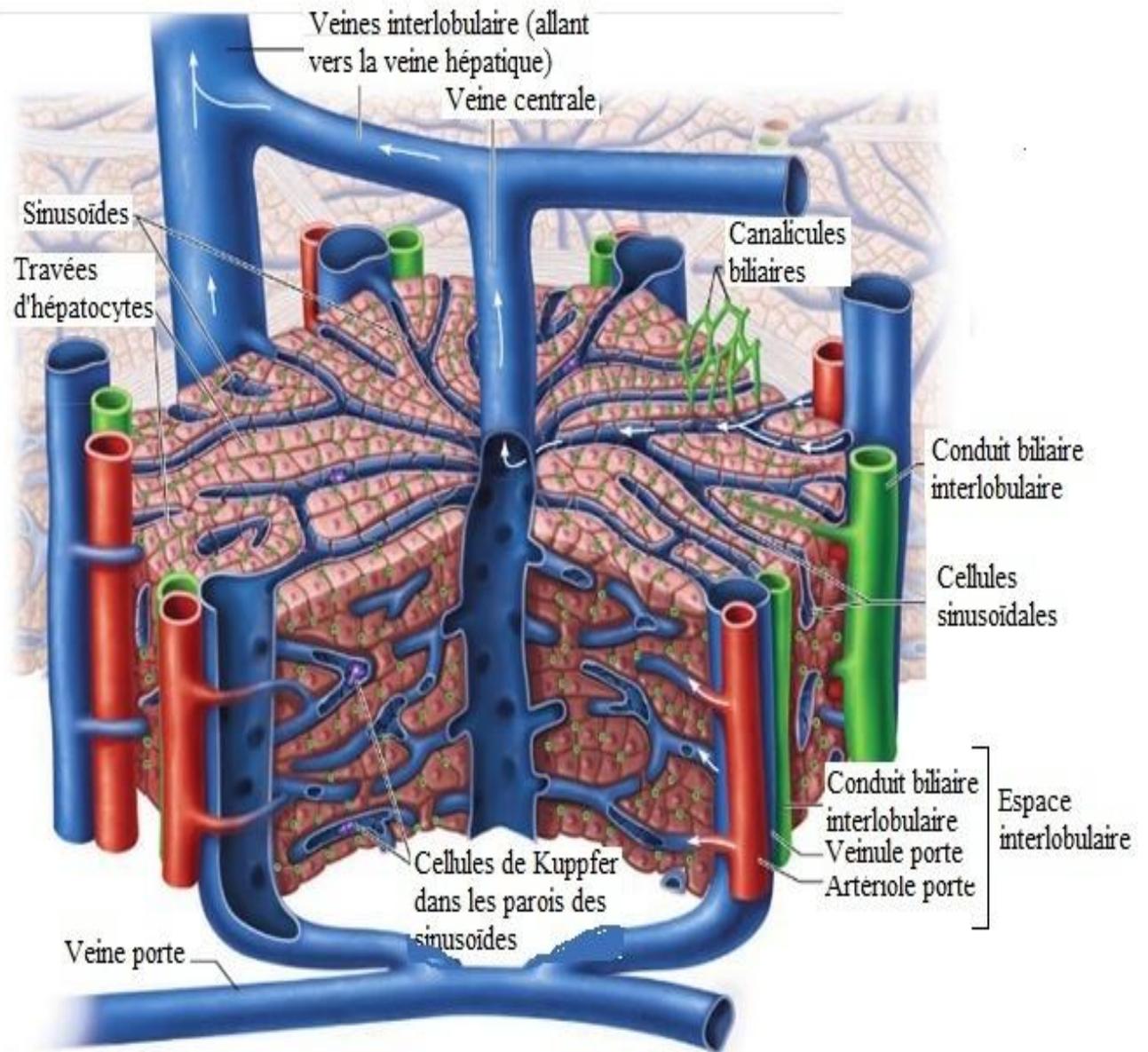
## I.1. Anatomie et histologie du foie

Chez l'homme, le foie est l'organe le plus volumineux pesant en moyenne 1.5 Kg et constitue 2% de la masse corporelle. Il est constitué de deux parties, le lobe gauche (1/3 du volume) et le lobe droit (2/3 du volume), séparés par le ligament falciforme. Ces lobes sont subdivisés en segments hépatiques délimités par des cloisons fibreuses. Ces dernières divisent ces segments en unités fonctionnelles plus petites, lobules hépatiques). Le lobule hépatique (**figure 1**) se présente sous forme d'un polyèdre pentagonal ou hexagonal. Chaque lobule est formé par un ensemble de cellules : hépatocytes, cellules de Kupffer, cellules sinusoidales et les cellules stellaires (Malarkey *et al.*, 2005). Sur les angles du lobule, courent les vaisseaux, artère hépatique, veine porte et le canal biliaire interlobulaire. L'ensemble constitue, avec le tissu conjonctif environnant l'espace porte (Ekataksin et Kaneda, 1999). Le foie est irrigué principalement par l'artère hépatique et la veine porte. Il est traversé par 1.4 litre de sang en moyenne à chaque minute. L'artère hépatique est responsable de l'apport d'oxygène, tandis que la veine porte est responsable quant à elle de l'apport des nutriments de l'intestin. Le retour veineux est assuré par les veines hépatiques. Après avoir irrigué l'ensemble des lobules hépatiques, le sang est évacué par les veines hépatiques, qui se jettent ensuite dans la veine cave inférieure qui retourne au cœur (Dooley *et al.*, 2011).

## I.2. Cellules du foie

### I.2.1. Hépatocytes

Les hépatocytes sont des cellules polyédriques de 20 µm de long sur 30 µm de large environ. Ils représentent 60% des cellules du foie humain. Environ 25% des hépatocytes sont binuclées. Le noyau de ces cellules est rond ou ovalaire situé au centre de l'hépatocyte. Ces cellules ne se divisent que rarement dans le foie normal. Les hépatocytes sont organisées en travées unicellulaires. Ils sont en contact avec les hépatocytes adjacents de la même travée par leurs membranes latérales, avec le canalicule biliaire par leur membrane canaliculaire, et avec l'espace de Disse par leur membrane sinusoidale (Malarkey *et al.*, 2005). Les hépatocytes sont responsables de la formation de la bile et des différentes réactions métaboliques (Pastor et Suter, 1999).



**Figure 1.** Structure d'un lobule hépatique (Marieb et Hoehn, 2015).

## **I.2.2. Cellules sinusoidales endothéliales**

Les cellules sinusoidales endothéliales tapissent les parois des sinusoides hépatiques et permettent la diffusion des molécules de faible poids moléculaire (LeCluyse *et al.*, 2012). Elles améliorent le transport passif de nombreux substrats endogènes et xénobiotiques entre le sang et la surface basolatérale des hépatocytes. Les cellules sinusoidales endothéliales ont une structure lâche (pas de membrane basale) ce qui favorise les échanges entre le sang et les hépatocytes, permettant ainsi une meilleure oxygénation des hépatocytes et une élimination plus efficace des xénobiotiques. Les sinusoides sont séparés des hépatocytes et plus particulièrement de leur membrane sinusoidale par l'espace de Disse (Dooley *et al.*, 2011).

La présence d'enzymes de détoxification attribue à ces cellules une capacité métabolique par rapport aux hépatocytes. En outre, les cellules endothéliales sinusoidales jouent un rôle important lors de la réponse inflammatoire. En réponse aux cytokines inflammatoires, ces cellules sont activées pour libérer des médiateurs qui régulent la fonction des cellules hépatiques tels que les chimiokines, l'IL-1, l'IL-6, le PAF, le facteur de croissance, les interférons, les eicosanoïdes, les enzymes protéolytiques...etc (Arii et Imamura, 2000 ; Enomoto *et al.*, 2004). Les cellules sinusoidales endothéliales peuvent également jouer un rôle dans la surveillance immunitaire et potentiellement dans le développement de la tolérance dans le foie, en exprimant les molécules CD40, CD54, CD80, CD86 et CMH de classe I et II, qui sont des marqueurs des cellules présentatrices d'antigène (Knolle et Gerken, 2000 ; Knolle et Limmer, 2003).

### **I.2.2.1. Cellules stellaires**

Les cellules stellaires ou Ito constituent 5% des cellules hépatiques et se situent dans l'espace périsinusoidal entre la surface basolatérale des hépatocytes et le côté anti-luminal des cellules endothéliales sinusoidales. Elles ont la fonction de stocker les graisses, notamment de la et la vitamine A. Ces cellules produisent des cytokines, des facteurs de croissance et des protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène et l'élastine (LeCluyse *et al.*, 2012). Cependant, lors des lésions hépatiques, les cellules stellaires perdent leurs gouttelettes lipidiques, prolifèrent et se transforment en cellules productrices de collagène et de laminine en induisant la fibrose, qui peut s'aggraver et se transformer en cirrhose hépatique (Friedman, 2008).

L'activation des cellules stellaires peut s'effectuer par les peroxydes lipidiques générés à partir d'hépatocytes endommagés, d'oxydants et de cytokines libérées à partir des cellules de Kupffer activées (Reeves et Friedman, 2002). Les cellules stellaires activées libèrent des médiateurs cytotoxiques et inflammatoires à savoir IL-1, IL-6, IL-10, le PAF, le facteur 1 stimulant les colonies (G-CSF), l'oxyde nitrique, le peroxyde d'hydrogène, les eicosanoïdes, la

gélatinase, la fibronectine, le TGF $\beta$  et la protéine chimiotactique 1 des macrophages (MCP-1) (Abbas *et al.*, 2012). Il a été montré que les cellules stellaires phagocytent les corps apoptotiques issus d'hépatocytes endommagés, ce qui stimule l'expression de TGF $\beta$  et la collagénation, conduisant ainsi à la fibrose (Higuchi et Gores, 2003 ; Zhan *et al.*, 2006).

### **I.2.2.2 Cellules de Kupffer**

Les cellules de Kupffer représentent 5 à 10% des cellules hépatiques. Elles sont des macrophages hautement mobiles localisées à l'intérieur de la micro-vascularisation sinusoidale, attachées à la face luminale des cellules endothéliales du sinusoiide (Dooley *et al.*, 2011). Elles remplissent leur rôle de macrophages en phagocytant les débris tissulaires/cellulaires ou encore les endotoxines bactériennes véhiculées par le sang. Les cellules de Kupffer jouent un rôle important dans les réponses immunitaires innées et adaptatives. Ces cellules sont activées par un large spectre d'agents, y compris les endotoxines, l'IFN $\gamma$ , les DAMPs, l'acide arachidonique et le TNF. Cette activation conduit à la production de cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, l'IL-10, IFN $\alpha$  et  $\beta$ , TGF $\beta$ ), de radicaux libres (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO) et de plusieurs prostanoïdes (Smedsrod *et al.*, 2009). Ces médiateurs peuvent être toxiques pour les cellules parenchymateuses et endothéliales. Toutefois, les cellules de Kupffer peuvent intervenir dans la modulation des activités métaboliques des hépatocytes via la production de cytokines. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires entraînent la suppression complète des cytochromes P450 impliqués dans la génération des intermédiaires toxiques des xénobiotiques (Morgan, 2009).

### **I.2.3. Cholangiocytes**

Les cholangiocytes sont les cellules épithéliales qui tapissent les canaux biliaires. Elles représentent environ 5% de la population cellulaires du foie. Ces cellules peuvent sécréter des cytokines et d'autres médiateurs et exprimer à leur surface des molécules d'adhérence, permettant ainsi un contact direct avec les cellules immunitaires (Glaser *et al.*, 2009). Les cholangiocytes sont aussi impliquées dans la sécrétion d'eau, d'ions organiques, de lipides, d'électrolytes et de bicarbonate. Ces cellules sont également impliquées dans la réabsorption du glucose et du glutathion. La bile produite par les hépatocytes est modifiée par la présence des produits sécrétés par les cholangiocytes dans les canalicules et dans les voies biliaires (Glaser *et al.*, 2009 ; Dooley *et al.*, 2011).

### I.3. Fonctions hépatiques

Grâce à ses fonctions exocrines et endocrines, le foie joue un rôle vital dans la régulation de l'homéostasie. Il est responsable de la sécrétion biliaire, le stockage des vitamines, le métabolisme de carbohydrates, de lipides et de protéines et la détoxification de xénobiotiques. Le foie participe à toutes les voies biochimiques de la croissance, du système immunitaire, du métabolisme et de la reproduction (Ward et Daly, 1999).

#### I.3.1. Production des sels biliaires

Les sels biliaires sont exclusivement synthétisés dans les hépatocytes à partir du cholestérol par addition d'un groupement OH sur le carbone 7 ainsi que la disparition de la double liaison (C5-C6). Les sels biliaires primaires (acide cholique et acide chénodéoxycholique) sont conjugués dans les hépatocytes avec des acides aminés; glycine ou taurine; puis ils sont sécrétés par voie active dans la bile. Une fois déversés dans la bile, ces sels subissent des modifications au niveau du colon sous l'action des enzymes de la flore bactérienne. Les sels biliaires secondaires (acide déoxycholique et acide lithocholique) ou tertiaires (acide sulfolithocholique et ursodéoxycholique) résultants, peuvent être réabsorbés et retournés au foie après passage dans le sang portal (Hofmann, 2009, Dooley *et al.*, 2011). Ils sont captés par les hépatocytes, conjugués avec des acides aminés puis sécrétés dans la bile. Ce cycle entérohépatique permet en permanence de maintenir une concentration élevée de sels biliaires dans les intestins. La présence de ces sels dans le tractus gastro-intestinal est nécessaire pour la digestion des lipides. Ces sels jouent également un rôle important dans la prévention de la formation des lithiases à partir du cholestérol dans la vésicule et les voies biliaires (Monfort, 2016).

#### I.3.2. Production de la bile

Au pôle sinusoidal de l'hépatocyte, les acides biliaires sont captés par un symport couplé au sodium (transport actif), et sont transportés vers le pôle canaliculaire par diffusion et leur sécrétion dans les canalicules se fait par diffusion simple ou transport actif. La bile est composée d'eau, d'électrolytes, d'acides biliaires, de cholestérol, de phospholipides et de bilirubine. Elle est produite dans trois régions différentes: bile hépatocyttaire, bile canalaire et bile vésiculaire. La bile est essentielle à l'élimination de nombreux déchets endogènes tels que la bilirubine et les médicaments. La bile est également essentielle à l'absorption lipidique intestinale et joue un rôle clef dans le contrôle de la balance du cholestérol. La bile a aussi un rôle de transporteur des

produits liposolubles jusqu'à l'intestin pour les éliminer après leur passage dans le foie (Wolkoff et Cohen, 2003 ; Dooley *et al.*, 2011).

### **I.3.3. Métabolisme des nutriments**

Les glucides sont absorbés au niveau de l'intestin grêle, puis ramenés au foie par la veine porte. Ils traversent la membrane sinusoidale par l'intermédiaire de transporteurs protéiques. Ces sucres pénètrent à l'intérieur des hépatocytes où ils peuvent subir soit une glycogénogénèse ou une glycolyse. Le foie assure également la glycogénolyse et la néoglucogénèse.

Le foie régule également le métabolisme des lipides, la production de triglycérides ainsi que la synthèse du cholestérol et sa dégradation en acides biliaires. La formation des lipoprotéines telle que les VLDL et les HDL est également effectuée au niveau du foie (Francis *et al.*, 2003 ; Bechmann *et al.*, 2012).

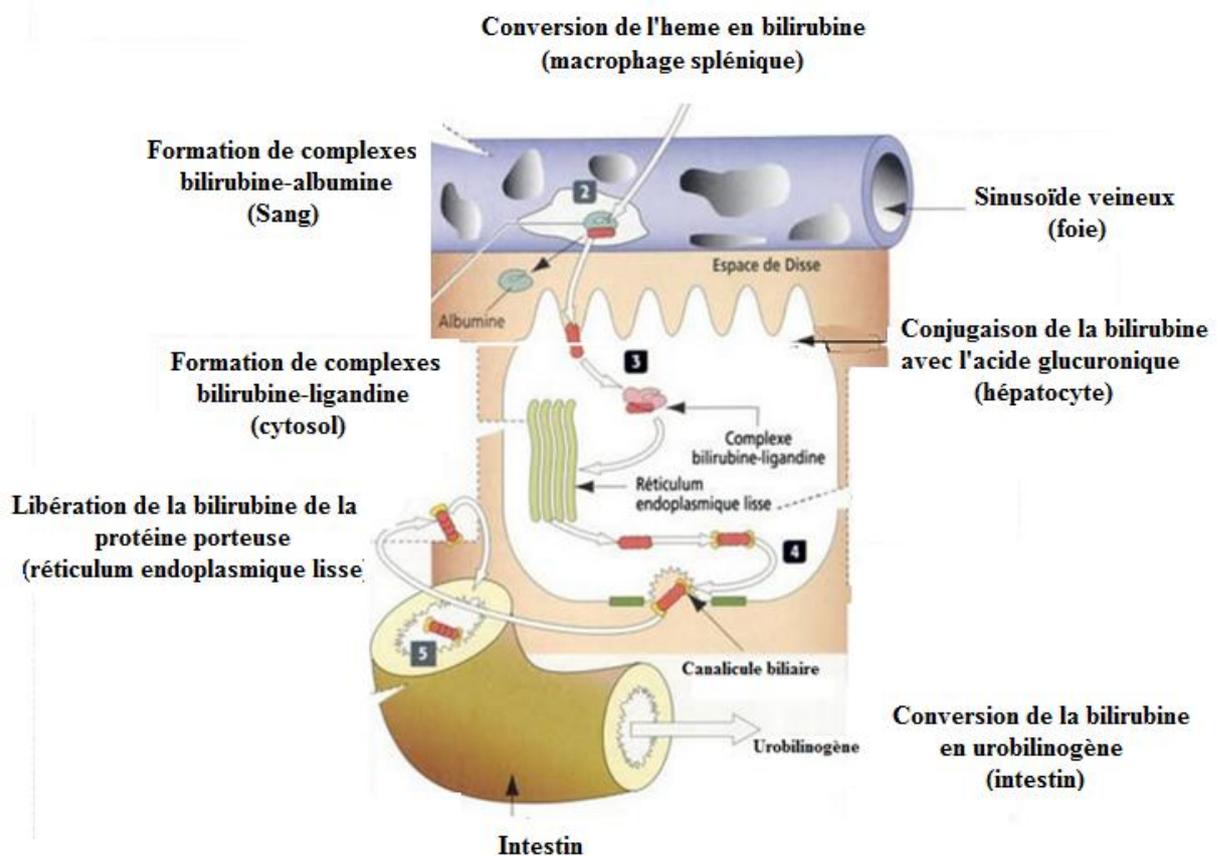
### **I.3.4. Détoxification**

Le foie est l'organe central de la détoxification des substances toxiques exogènes et endogènes. Bien que les substances hydrosolubles sont éliminées facilement par les reins, les substances lipophiles doivent être transformées dans les hépatocytes avant leur excrétion (Zollner et Trauner, 2006; Sendensky et Dufour, 2011).

Le processus de détoxification passe par trois phases. Les substances lipophiles sont transformées dans une première phase avec un groupement amine, carboxyl, hydroxyl ou thiol augmentant ainsi la polarité de la molécule. Cette réaction peut être suffisante pour rendre les substances hydrophiles et améliorer l'excrétion rénale. La seconde phase consiste à conjuguer les produits issus de la phase I avec d'autres substances dérivées du foie telles que l'acide glucuronique, les acides aminés, l'acide sulfurique ou l'acide mercapturique. Le produit conjugué caractérisé par une hydrophilie accrue en raison de ses caractéristiques les plus souvent acides peut être excrété plus facilement par les reins ou dans la lumière intestinale par excrétion dans la bile. La troisième phase consiste à pomper les composés nocifs conjugués avec le glucuronide, le glutathion et le sulfate dans la bile ou dans le sang (Custodio *et al.*, 2008).

L'ammoniaque, qui est naturellement produite par le colon lors de la décomposition du contenu digestif, possède une forte toxicité neurologique. Transportée au foie par la veine porte, celle-ci est dégradée par les hépatocytes en urée, puis éliminée dans les urines (Dhiman et Chawla, 2008; Natesan *et al.*, 2016).

Les érythrocytes sénescents sont détruits dans la rate, où la dégradation de l'hémoglobine produit de la bilirubine (hydrosoluble) non conjuguée. Cette molécule est reprise par les hépatocytes. La bilirubine intracellulaire se lie à des protéines cytosoliques spécifiques (ligandine et protéine Z), empêchant ainsi sa toxicité intracellulaire. La bilirubine se conjugue avec le glucuronide au niveau du réticulum endoplasmique lisse. Par conséquent, la bilirubine conjuguée est hydrosoluble et est excrétée dans la bile (Ganong, 2005). Dans le tractus intestinal, la bilirubine conjuguée est métabolisée par les bactéries intestinales via la  $\beta$ -glucuronidase et libère la bilirubine libre, qui est réduite en urobilinogène. Ce dernier lié à l'albumine est excrétée dans l'urine. Certaines molécules d'urobilinogène sont converties en stercobilinogène dans l'intestin et excrété dans les selles (**figure 2**). Dans la jaunisse obstructive (cholestatique), la bilirubine conjuguée régurgite dans le sang et grâce à son hydrosolubilité elle est excrétée dans l'urine (Khan *et al.*, 2015).



**Figure 2.** Métabolisme de la bilirubine (Kierszenbaum, 2002)

Dans l'ictère obstructif, moins de bilirubine conjuguée est prise par l'intestin, et par conséquent moins de stercobilinogène se trouve dans les selles. Les individus normaux ont surtout la bilirubine non conjuguée dans leur sang, l'urobilinogène dans leur urine et le stercobilinogène dans leurs selles (Kamisako *et al.*, 2000 ; Dasgupta et Wahed, 2014). Cependant, certains composés de la bile tels que les acides biliaires et le cholestérol peuvent être réabsorbés (Zollner et Trauner, 2006 ; Maronpot *et al.*, 2010).

### I.3.5. Régénération

Le foie possède une caractéristique spéciale de reconstituer les parties qui lui ont été enlevées. Jusqu'à 80% de la fonction hépatique peut être maintenue même après une hépatectomie importante. L'activation des cellules de Kupffer semble nécessaire pour une activité régénérative optimale du foie, probablement due à la libération de TNF $\alpha$  et d'IL-6 (Taub *et al.*, 2003). Ces cytokines initient la prolifération des hépatocytes, au moins en partie, par l'intermédiaire de facteurs de transcription tels que NF-kB et STAT-3. En effet, ces deux cytokines stimulent les hépatocytes quiescentes (phase G<sub>0</sub>) pour entrer dans le cycle cellulaire (Schmidt-Arras et Rose-John, 2016).

Les macrophages non résidents, peuvent être attirés sous l'effet de plusieurs médiateurs chimiques y compris les protéines chimiotactiques produites suite aux lésions des hépatocytes (Abbas *et al.*, 2012). L'activation de ces macrophages apparaît durant la régénération. La liaison de la chimiokine MCP-1 (C-C motif chimiokine 2) à son récepteur CCR2 semble jouer un rôle dans le recrutement de macrophages et la libération de cytokines qui peuvent contribuer à la résolution des lésions (Dambach *et al.*, 2002). D'autres chimiokines telles que l'IL-8, la CXCL2 et la CXCL5 pourraient également contribuer à la prolifération des h hépatocytes (Hogaboam *et al.*, 1999).

## I.4. Atteintes hépatiques

Les complications des maladies métaboliques telles que le diabète, les maladies auto-immunes, les maladies du système cardiovasculaires peuvent conduire aux maladies hépatiques. De plus, la prise de certains médicaments aboutit au développement des réactions inflammatoires responsables de ces maladies. Les lésions hépatiques induites par les médicaments (**tableau 1**) peuvent imiter toutes les formes de maladies hépatobiliaires aiguës et chroniques (Abboud et Kaplowitz, 2007).

**Tableau 1.** Principaux mécanismes des lésions hépatiques induites par les médicaments et certains produits chimiques (Sahu, 2007)

Mécanisme	Médicament
Métabolisme lipidique altéré, causant le foie gras	Amineptine, amiodarone, doxycycline, tetracycline, tianeptine, pirprofen.
Diminution de la clairance des sels biliaire, provoquant une cholestase	Cyclosporine A, estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronide, tauroolithocholate, ethinyl estradiol
Formation d'adduit protéique, induisant une réaction immunitaire	Flucloxacilline, diclofenac, acide tienilique, sulfamethoxazole, Halothane
Augmentation du stress oxydatif, entraînant des lésions cellulaires	Sodium diethyldithiocarbamate, diclofenac, ketoconazole, paracétamol et médicaments causant la stéatohépatite
Diminution de la fonction mitochondriale ; entraînant une apoptose ou une nécrose	Nimesulide, amiodarone, tamoxifen, stavudine, zidovudine et médicaments causant la stéatohépatite
Mort cellulaire médiée par les LT cytotoxique	Sulfamethoxazole, lidocaine, carbamazepine, lamotrigine, phenindione
Réparation tissulaire incomplète ou dysrégulée	Paracétamol, tétrachlorure de carbone, chloroforme, thioacetamide, trichloroethylene

Environ 50% des insuffisances hépatiques aiguës sont induites par les médicaments (Pandit *et al.*, 2012). Ceci s'explique par le fait que les médicaments sont métabolisés et éliminés par le foie. En cas d'hépatite médicamenteuse, le foie ne parvient plus à assurer le rôle de détoxification, ce qui se traduit par un blocage de la bile et/ou une destruction des cellules du foie (Zimmerman, 1999). Cependant, les manifestations cliniques prédominantes ressemblent à un ictère hépatocellulaire aiguë ou hépatite cholestatique. Le premier est plus grave, car la mortalité se rapproche de 10% (Andrade *et al.*, 2005).

### I.4.1. Insuffisance hépatique

L'insuffisance hépatique aiguë (IH) est le syndrome clinique de l'insuffisance sévère de la totalité des fonctions hépatique (encéphalopathie, coagulopathie et ictère) (Dooley *et al.*, 2011). Deux types d'IH sont distingués, l'IH aiguë et l'IH chronique. Le premier type (hépatites toxiques, médicamenteuses, virales, auto-immunes, maladie de Wilson, hépatite d'origine tumorale ou cardiovasculaire) survient chez les individus sains, tandis que le deuxième type survient chez les individus souffrant déjà d'hépatopathies chroniques, principalement des cirrhoses. Selon O'Grady et Schalm (1993), l'insuffisance hépatique aiguë peut être classée selon sa sévérité en IH aiguë sévère, IH fulminante et IH subfulminante (**tableau 2**). La détermination de ces types est basée sur l'évaluation de la déplétion en facteurs de la coagulation, particulièrement le facteur V, la présence ou non d'une encéphalopathie hépatique, et le délai d'apparition de l'ictère.

**Tableau 2.** Classification des hépatites aiguës (O'Grady et Schalm, 1993).

	Facteur V	Encéphalopathie hépatique	Intervalle entre l'ictère et Encéphalopathie hépatique
L'IH aiguë sévère	< 50%	Absente	
L'IH aiguë fulminante	< 50%	Présente	< 2 semaines
L'IH aiguë subfulminante	< 50%	Présente	2 semaines à 3 mois

L'hépatite fulminante est une inflammation aiguë du foie qui se manifeste par une cytolyse hépatique et une nécrose massive du parenchyme hépatique. Elle peut être le résultat de la complication de l'insuffisance hépatique. Elle est caractérisée par une altération des fonctions de synthèse du foie, notamment la sythèse des facteurs de coagulation, ou une atteinte de l'excrétion de la bilirubine (hyperbilirubinémie), ou d'une diminution de la capacité de dégradation de l'ammoniac (Dooley *et al.*, 2011). L'augmentation du taux d'ammoniac est associée à des

troubles neurologiques (encéphalopathie hépatique). La guérison de cette maladie peut être spontanée, mais en cas d'évolution, cette maladie donne des lésions irréversibles qui sans transplantation hépatique aboutit à la mort (Boudjema *et al.*, 1997).

L'insuffisance hépatique aiguë implique une nécrose significative des hépatocytes et incite une production massive de cytokines. La production de cette famille de protéines entraîne une réponse inflammatoire systémique, une défaillance systémique de plusieurs organes et finalement la mort (Rolando *et al.*, 2000).

#### **I.4.2. Encéphalopathie hépatique**

L'encéphalopathie hépatique (EH) est une complication neuropsychiatrique associée aux maladies du foie dont les symptômes varient en fonction de la gravité de la complication. Ses symptômes peuvent se présenter sous forme de complications neurologiques, psychiatriques et motrices et peuvent progresser jusqu'au coma et la mort (Clément, 2015).

La cause principale de l'encéphalopathie hépatique est la diminution de la capacité des hépatocytes de dégrader l'ammoniac (Dooley *et al.*, 2011). En effet, l'ammoniac est éliminé essentiellement sous forme d'urée ou d'urates après transformation par le cycle de l'urée dans le foie. L'excrétion s'effectue en grande partie par voie urinaire et plus rarement par hydrolyse dans le tube digestif. L'encéphalopathie hépatique peut résulter d'une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, des perturbations du transport de certains acides aminés nécessaires à la synthèse de neurotransmetteurs et d'une accumulation de substances neurotoxiques telles que l'ammoniac et les acides gras libres (Kodali et McGuire, 2015).

L'encéphalopathie hépatique aiguë peut survenir chez les patients ayant une hépatite virale fulminante ou une hépatite toxique, tandis que l'encéphalopathie hépatique chronique survient le plus souvent chez les patients ayant une cirrhose (Jepsen *et al.*, 2010). Dans le premier cas, l'œdème cérébral conduisant à l'augmentation du débit sanguin cérébral et l'hypertension intracrânienne est l'une des principales causes de mortalité (Bjerring *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2013).

Le développement de l'encéphalopathie hépatique durant l'insuffisance hépatique fulminante signale une phase critique de la maladie (Vaquero *et al.*, 2003).

#### **I.4.3. Cholestase (Stase biliaire)**

La cholestase est due à des agressions virales et toxiques comme elle peut être liée à une prédisposition génétique. Elle peut être obstructive, par présence d'un obstacle sur les voies biliaires macroscopiques, ou non obstructive par atteinte des cellules épithéliales des voies

biliaires interlobulaires ou du pôle biliaire des hépatocytes (Sahu, 2007 ; Dooley *et al.*, 2011). La cholestase est caractérisée par des perturbations engendrées par une diminution ou une interruption d'excrétion biliaire. Les conséquences biologiques sont les mêmes, quel que soit le niveau d'atteinte biliaire. Le signe principal est l'élévation des phosphatases alcalines sanguines (Yang *et al.*, 2013).

#### **I.4.4. Stéatose**

La stéatose est l'accumulation des triglycérides au sein des hépatocytes. Elle peut apparaître lorsque la personne souffre d'une obésité, d'un diabète ou de troubles de la répartition des graisses dans l'organisme (Marchesini *et al.*, 2003 ; Sung et Kim, 2011). L'infection par VIH et la prise de certains anti-rétroviraux accroissent le risque d'apparition de ce processus, tout comme l'hépatite causée par les médicaments (amiodarone, perhexiline et tétracycline). Le stress oxydant et les anomalies du métabolisme des acides gras peuvent également participer à cette pathologie (Sahu, 2007 ; Pol, 2009 ; Upadhyay *et al.*, 2010).

Deux formes de stéatoses hépatiques peuvent être distinguées ; la stéatose microvésiculaire et la stéatose macrovésiculaire. La première forme est caractérisée par la présence de nombreuses microvésicules lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes. Ces gouttelettes sont de taille inférieure à celle du noyau qui reste en position centrale. Quand les gouttelettes lipidiques à l'intérieur des hépatocytes grandissent, le noyau est déplacé vers la périphérie et la stéatose devient macrovésiculaire.

La stéatose microvésiculaire est la conséquence d'une importante inhibition de la dégradation des lipides par la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. Elle provoque des lésions hépatiques potentiellement sévères associées généralement à une défaillance hépatique et une hypoglycémie importante (El-Badry *et al.*, 2007, Yerian, 2012). Par contre la stéatose macrovésiculaire peut être induite par une inhibition modérée de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale, mais également par une augmentation de la synthèse *de novo* de lipides et une diminution de l'export des triglycérides par une altération de la sécrétion de VLDL (Fromenty *et al.*, 2003).

La stéatohépatite peut être le résultat de la progression des stéatoses macrovacuolaires. Différents facteurs peuvent induire la mort cellulaire, l'inflammation et la fibrogenèse, tels que la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, de produits réactifs de la lipoperoxydation et diverses cytokines (Fromenty *et al.*, 2003).

### **I.4.5. Cytolyse**

Le syndrome de cytolyse se définit comme l'ensemble des signes liés à une lésion des membranes hépatocytaires. La destruction membranaire conduit à la nécrose hépatocytaire et à la libération du contenu intracellulaire, spécialement les transaminases et la lactate déshydrogénase, dans les sinusoides. Une élévation importante (10 fois les valeurs normales) des transaminases témoigne d'une cytolyse hépatique (Ward et Daly, 1999). Le mécanisme impliqué dans cette lyse peut être immunologique. En effet, Satoh et ses collaborateurs (1985) ont montré que le métabolisme de l'halothane engendre la formation des haptènes. Ces derniers se lient de façon covalente aux protéines hépatiques microsomiales et forment des néo-antigènes. La présence de ces nouveaux antigènes déclenche la synthèse d'IgG spécifiquement dirigées contre les hépatocytes.

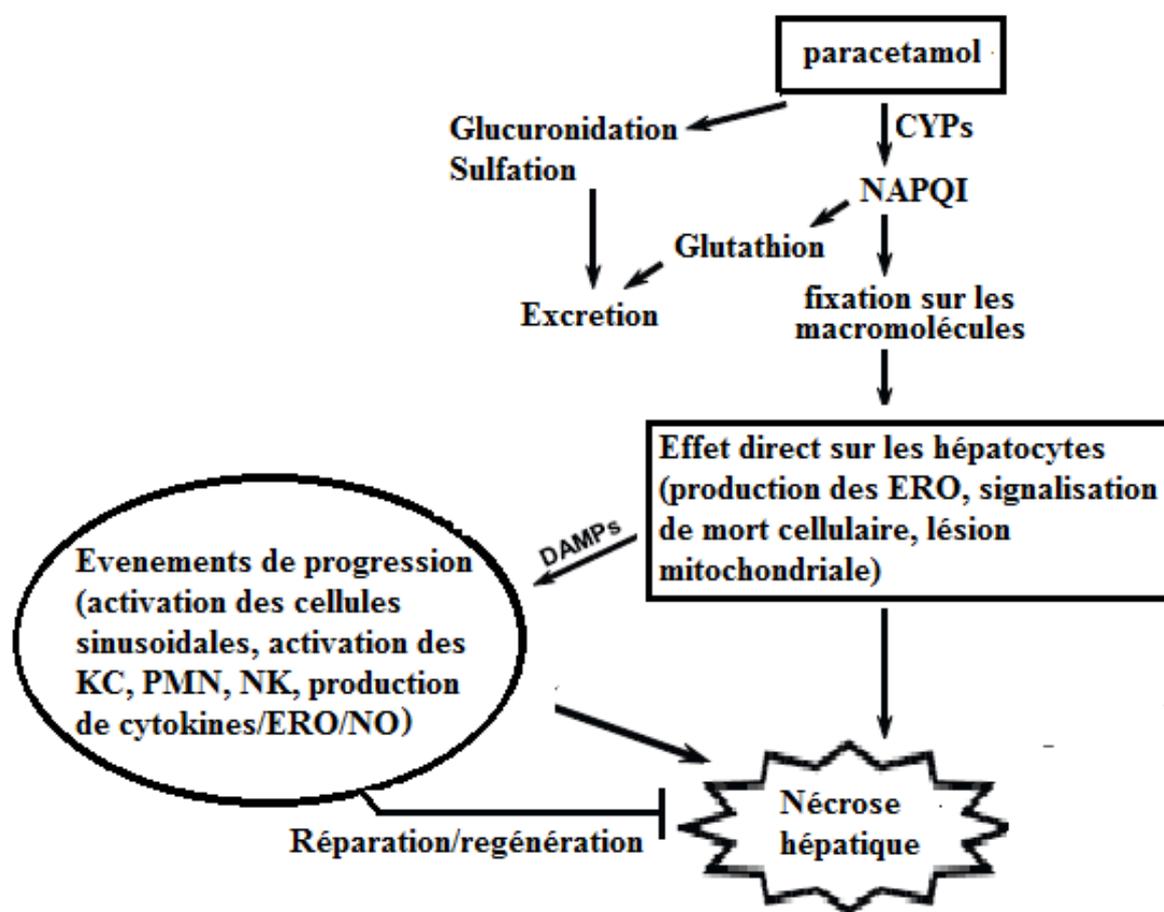
### **I.4.6. Cirrhose**

La cirrhose est l'étape finale de la plupart des maladies chroniques du foie. C'est une pathologie chronique induite par l'inflammation chronique, qui entraîne la destruction des hépatocytes. Cette destruction est suivie par l'apparition de lésions qui se cicatrisent et génèrent une fibrose cicatricielle irréversible. De ce fait, l'organisation lobulaire normale du foie est complètement détériorée (Dooley *et al.*, 2011). Deux types de cirrhose peuvent être distingués ; la cirrhose compensée et la cirrhose décompensée. La cirrhose compensée se caractérise par l'absence de signes cliniques et de perturbations biochimiques. Elle est considérée comme stable et peut durer plusieurs mois à plusieurs années. Ce type de cirrhose est alors découvert fortuitement à l'occasion d'un examen clinique ou d'anomalies des tests hépatiques effectués systématiquement. Toutefois, à tout moment, une décompensation de la cirrhose peut avoir lieu. Elle se traduit par diverses manifestations cliniques telles qu'un ictère, une ascite, une hypertension portale ou une encéphalopathie hépatique (Schuppan et Afdhal, 2008).

## **I.5. Relation entre stress oxydant, inflammation et maladies hépatiques**

Le stress oxydant survient lors d'un déséquilibre entre la génération et l'élimination des radicaux libres. Ce déséquilibre est considéré comme facteur principal dans la pathogenèse des maladies hépatiques et dans leur progression vers la fibrose et la cirrhose (Cohen *et al.*, 2011). La chaîne respiratoire mitochondriale représente la principale source des espèces réactives oxygénées (ERO) et des espèces réactives azotées (RNS). L'augmentation de l'expression et de l'activité des cytochromes, principalement le CYP2E1, représente également une source

importante de production d'ERO, au niveau du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie. En outre, les ERO/RNS peuvent être formés suite au métabolisme de certains médicaments par les cytochromes au niveau des hépatocytes (Aubert *et al.*, 2011). Ainsi, le stress oxydant mitochondrial joue un rôle dans de nombreuses formes de lésions hépatiques. Dans l'hépatotoxicité induite par le paracétamol en particulier, le stress oxydant mitochondrial est un élément critique du mécanisme de la lésion (**figure 3**).



**Figure 3** : Mécanisme d'induction du stress oxydant et de lésions hépatiques par le paracétamol (Roth et Ganey, 2013)

Il a été démontré que l'hépatotoxicité induite par le paracétamol, implique la formation des radicaux superoxyde et de peroxy-nitrite (Jaeschke *et al.*, 2012). Des preuves récentes suggèrent que les endommagements mitochondriaux et le stress oxydant se produisent également chez l'homme lors de l'intoxication par le paracétamol (McGill *et al.*, 2012 ; Jiang *et al.*, 2015 ; Park *et al.*, 2016).

La production excessive des radicaux libres peut conduire à une peroxydation lipidique accrue et la formation des aldéhydes réactifs, tels que le malondialdéhyde (MDA). La

peroxydation lipidique se produit quand un radical hydroxyle extrait un électron d'un acide gras insaturé formant ainsi un radical lipide instable. Ce dernier peut réagir avec l'oxygène et former par la suite un radical péroxyle, qui réagit à son tour avec un autre acide gras insaturé pour former des acides gras hydroperoxyde, propageant ainsi la lésion.

Des cycles répétés de peroxydation lipidique, comme dans le cas de l'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>), peuvent causer de graves endommagements aux membranes cellulaires (Jayakumaret *al.*, 2006). L'oxydation des lipides membranaires des hépatocytes provoque le dysfonctionnement des organelles et la nécrose cellulaire (McGill et Jaeschke, 2013).

En outre, les radicaux libres et les produits réactifs de la peroxydation lipidique peuvent directement endommager l'ADN mitochondrial, induisant ainsi une production encore plus élevée d'ERO (Browning et Horton 2004; Begriche *et al.*, 2011).

Les réactions inflammatoires déclenchées aux cours de la lésion hépatocellulaire produite par des agents toxiques entraîne la libération de plusieurs molécules telles que HSP70 et l'ADN endommagé. Ces molécules (DAMPs) associées à l'endommagement cellulaire et tissulaire interagissent avec les TLR (Toll-like receptors) exprimés à la surface des cellules du système immunitaire inné (Martin-murphy *et al.*, 2010 ; Abbas *et al.*, 2012). L'activation des TLR par ces DAMP semble contribuer à la progression de la lésion. L'ADN libéré des cellules endommagées au cours de l'intoxication par les toxines comme le CCl<sub>4</sub> et le paracétamol active les cellules de Kuppfer via les TLR9. Cette activation se traduit par la sécrétion des cytokines pro-inflammatoire (IL-1, IL-6, IL-12 et TNF $\alpha$ ) et des chimiokines (IL-8). Par contre, les souris déficientes en TLR9 ou traitées avec un antagoniste de TLR9 peuvent réduire les endommagements du foie et l'expression des cytokines inflammatoires (Imaeda *et al.*, 2009). En outre, les médiateurs pro-inflammatoires libérés par les cellules de Kuppfer sont responsables du recrutement des polynucléaires neutrophiles qui sont capables d'amplifier la réaction inflammatoire par la production des ERO supplémentaires (Abbas *et al.* 2012). Les ERO peuvent activer la synthèse de collagène et de protéines de la matrice extracellulaire par les cellules stellaires conduisant ainsi à une fibrose (Browning et Horton 2004; Lanthier *et al.*, 2009).

## I.6. Hépatotoxines

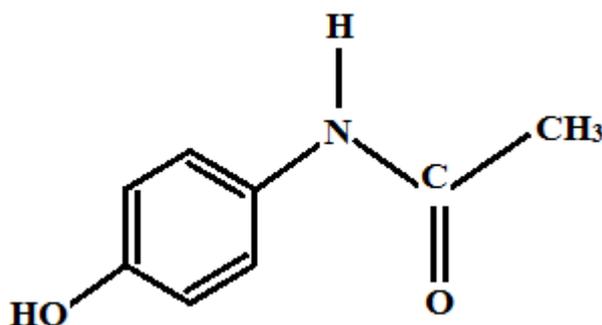
Les hépatotoxines sont des molécules chimiques, qui une fois dans l'organisme induisent des atteintes hépatiques plus ou moins graves. Beaucoup de médicaments et de produits chimiques ont été rapportés comme des inducteurs de l'hépatotoxicité (Biour *et al.*, 2004;

Upadhyay *et al.*, 2010). En fait, la cause principale de retrait de médicaments par la FDA (food and Drug Administration) aux États-Unis est l'induction de l'hépatotoxicité (Pandit *et al.*, 2012).

Dans le cadre des risques professionnels, plusieurs métiers figurent parmi les facteurs déclenchant ces atteintes hépatiques toxiques. Les peintres, les menuisiers et les agriculteurs par exemple sont exposés à certaines molécules hépatotoxiques telles que le chlorobenzène et le dichloropropane. Le chlorobenzène entre également dans la composition des fongicides et des insecticides. Cette molécule est responsable des atteintes hépatiques cytolytique. Parmi les solvants utilisés dans l'industrie des matières plastiques et des cuirs synthétiques figurent la pyridine et le diméthylformamide. Ce dernier est un solvant des pesticides, des colles, des peintures et des vernis. Ces solvants sont responsables de l'hépatite cytolytique (Conso et Hermouet, 1993).

### I.6.1. Le paracétamol

Le paracétamol (Hydroxy-4 acétanilide) ou l'acétaminophène est un antalgique/antipyrétique à effet rapide, peu soluble dans l'eau. Il appartient à la famille des antalgiques non opiacés, de palier I de la classification de l'OMS. Ce composé organique comprend un noyau benzénique et une fonction alcool et une fonction amide (**figure 4**). Le paracétamol inhibe la production des prostaglandines et donc bloque l'influx nerveux qui génère la sensation de douleur (Garry et Kieran, 2005).



**Figure 4** : Structure chimique du paracétamol (C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>)

En doses thérapeutiques normales, le paracétamol est généralement considéré comme l'un des analgésiques les plus sûrs. Cependant, le surdosage peut causer des lésions hépatiques graves et même une insuffisance hépatique. L'intoxication au paracétamol conduit à une hépatite cytolytique avec nécrose hépatique essentiellement centrolobulaire (Louvet *et al.*, 2008). Aux

Etats-Unis et au Royaume-Uni, la consommation excessive du paracétamol représente la cause la plus fréquente d'insuffisance hépatique induite par les médicaments (Lee, 2004).

La toxicité induite par le paracétamol est due à une accumulation anormale de son métabolite instable, le *N*-acétyl *p*-benzoquinone imine (NAPQI), qui entraîne des dysfonctions cellulaires en perturbant l'homéostasie calcique, diminuant les réserves d'ATP, augmentant la production de radicaux libres et la peroxydation lipidique et induisant des dysfonctions mitochondriales et enfin la mort cellulaire (Amathieu *et al.*, 2013).

Normalement le NAPQI est conjugué avec le glutathion cellulaire pour être éliminé dans la bile. Cette molécule nocive consomme le glutathion et se lie dans sa déplétion de façon covalente aux protéines. Ceci conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium, la translocation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bid vers la mitochondrie et à la formation des radicaux peroxydants au niveau des mitochondries. Les radicaux libres formés anéantissent la synthèse de l'ATP. En conséquence, le facteur induisant l'apoptose (AIF) et l'endonucléase G induisent la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN nucléaire (Susin *et al.*, 2000 ; Van Loo *et al.*, 2001).

Les endommagements de l'ADN et l'altération fonctionnelle des mitochondries, ainsi que l'activation des protéases intracellulaires (calpaïnes), conduisent à une dégradation de la membrane plasmique et à une nécrose oncotique des cellules hépatiques (Sahu, 2007).

### **I.6.2. Le tétrachlorure de carbone**

Le tétrachlorure de carbone ( $\text{CCl}_4$ ) est un solvant organochloré très volatil et peu soluble dans l'eau. Il est utilisé dans les laboratoires et certaines industries agroalimentaires. Il est également utilisé comme agent nettoyant et dégraissant industriel (Sahu, 2007).

Le  $\text{CCl}_4$  est principalement métabolisé dans le foie. Des études sur les microsomes hépatiques humains ont montré que le CYP2E1 est la principale enzyme humaine qui catalyse la déchloration réductrice du tétrachlorure de carbone, formant le radical réactif trichlorométhyle ( $\text{CCl}_3\cdot$ ) (Manibusan *et al.*, 2007). Dans les conditions anaérobiques, ce radical peut former du chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) après avoir réagi avec l'hydrogène et l'hexachloroéthane après dimérisation. Par contre, dans les conditions aérobiques, le radical  $\text{CCl}_3\cdot$  peut réagir avec l'oxygène et former le radical trichlorométhylperoxy ( $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ ). Ce radical hautement réactif peut provoquer la peroxydation des lipides ou réagir et produire du phosgène ( $\text{COCl}_2$ ) (Manibusan *et al.*, 2007). La déchloration hydrolytique du phosgène entraîne la formation de dioxyde de carbone (Weber *et al.*, 2003). L'haloalkylation de macromolécules cellulaires par les métabolites réactifs du  $\text{CCl}_4$  peut entraver les fonctions cellulaires. Le métabolisme du  $\text{CCl}_4$  par

les microsomes hépatiques provoque la formation de liaisons covalentes entre les radicaux  $\text{CCl}_3$  et les lipides. Cette haloalkylation des lipides intervient aux premières étapes de la sécrétion de lipides altérés par l'appareil de Golgi, ce qui peut entraîner une dégénérescence lipidique (Basu, 2003). Cette destruction a un effet sur la perméabilité des mitochondries, du réticulum endoplasmique et des membranes plasmiques, ce qui altère les fonctions cellulaires qui dépendent de l'intégrité de la membrane.

## **I.7. Traitement des maladies hépatiques**

### **I.7.1. Traitement classique**

Des stéroïdes et des médicaments immunosuppresseurs peuvent être utilisés dans l'hépatite auto-immune. Le traitement antiviral est utile pour l'hépatite B et C. L'acide ursodésoxycholique doit être administré au début de la cirrhose biliaire primaire et être poursuivi à long terme. Dans la cirrhose alcoolique, l'abstinence est indispensable. La perte de poids et le suivi d'un régime alimentaire sain peut être bénéfique dans la stéatose et les maladies hépatique non alcoolique. Si la maladie est induite par une intoxication médicamenteuse comme le paracétamol par exemple, l'utilisation de l'antidote (N- acétyl cystéine) est indispensable, du fait que cette molécule est le précurseur du glutathion nécessaire pour la conjugaison du métabolite actif (NAPQI) (Sahu, 2007 ; Dooley *et al.*, 2011).

Les antibiotiques sont indiqués en cas des maladies hépatiques car ils préviennent ou diminuent les signes d'encéphalose hépatique, par la diminution de production de  $\text{NH}_3$  par la flore digestive, la diminution de production d'acides gras volatils et la diminution de la conversion de la méthionine en mercaptans par la flore intestinale (Fromonot, 2001).

Parmi ces antibiotiques, la néomycine est utilisée afin de modifier la flore intestinale, et par conséquent l'inhibition de la production de  $\text{NH}_3$  responsable de la neurotoxicité (Hawkins *et al.*, 1994). La néomycine est utilisée en association avec le lactulose, disaccharide hydrolysé par les bactéries du colon. Le lactulose conduit à une acidification qui favorise la baisse de la concentration en ammonium  $\text{NH}_3$  (Als-Nielsen *et al.*, 2004). Cependant, quelques classes d'antibiotiques peuvent aggraver les maladies hépatiques, il s'agit des tétracyclines, des macrolides et des sulfamides (Sahu, 2007).

### **I.7.2. Traitement alterne**

Les médicaments à base de plantes sont la forme la plus lucrative de la médecine traditionnelle dont il dépend environ 80% de la population. L'effet hépatoprotecteur des plantes

est souvent basé sur une connaissance empirique et sur une tradition transmise de génération en génération. Pour certaines plantes, il existe une base scientifique expérimentale. Ainsi, il a été rapporté qu'environ 160 phytoconstituants de 101 plantes médicinales ont une activité hépatoprotectrice (Mohamed Saleem *et al.*, 2010). De nombreuses expériences ont montré que plusieurs plantes telles que *Silybum marianum*, *Andrographis paniculata*, *Curcuma longa*, *Picrorrhiza kurroa*, *Aquilaria agallocha* sont suffisamment actives contre certaines hépatotoxines. En effet, Alam et ses collaborateurs (2017) ont étudié l'effet de l'extrait éthanolique de *Aquilaria agallocha* contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol chez les rats. Cette équipe a démontré que cet extrait diminue le taux des transaminases hépatiques, de PAL, de LDH et de bilirubine. En outre, Saleem et ses collaborateurs (2014) ont étudié l'effet des extraits de *Rumex dentatus* contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol chez les souris. Ils ont démontré eux aussi, que cette plante réduit le taux d'ALT, d'AST, de PAL et de bilirubine. Gnanadesigan et ses collaborateurs (2016) ont aussi montré que les extraits hydro-alcooliques des feuilles de *Ceriops decandra* diminuent le taux d'ALT, d'AST, de PAL, de bilirubine, de cholestérol et de LDH.

## II. *Santolina chamaecyparissus*

### II.1. Description et classification botanique

Le genre *Santolina* regroupe plus de 10 espèces largement répandues dans la région méditerranéenne (Derbesy *et al.*, 1989). *Santolina chamaecyparissus* L., connue sous le nom de « El djaada » à l'est de l'Algérie, fait partie de ce genre. C'est une plante aromatique qui pousse sous forme d'un arbrisseau de 50 cm d'hauteur avec des inflorescences solitaires jaunes (8 à 10 mm). Ces dernières sont des capitules de fleurons reposant sur un involucre de bractées. Les inflorescences se situent au sommet des rameaux. *Santolina chamaecyparissus* possède de très nombreuses tiges ligneuses très ramifiées (**figure 5**) qui se développent en touffes denses (Bajaj, 1994 ; Giner Pons et Rios canavate, 2000). La taxonomie de *Santolina chamaecyparissus* selon ITIS report et NCBI est la suivante :

Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Santolina</i>
Espèce	<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.



**Figure 5 :** Photographie de *Santolina chamaecyparissus*

## II.2. Utilisation traditionnelle

*Santolina chamaecyparissus* est utilisée en médecine traditionnelle dans tout le nord d'Afrique. Les fleurs et les feuilles sont utilisées pour expulser les parasites intestinaux, le plus souvent sous forme de tisanes préparées soit par décoction ou par infusion. Les fleurs sont également utilisées pour leurs propriétés analgésiques, antispasmodiques, bactéricides et digestives (Cuellar *et al.*, 1998 ; Da silva, 2004). En infusion, les fleurs et les feuilles sont utilisées pour traiter la mauvaise digestion ainsi que les problèmes menstruels (Grosso *et al.*, 2009). La poudre de la santoline est utilisée localement pour soulager les douleurs liées aux piqûres des insectes comme elle est utilisée comme répulsif (Chaumont et Millet-Clerc, 2011). Quand elle est appliquée sur les plaies, elle accélère la cicatrisation (Ahuja *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2008). *Santolina chamaecyparissus* est utilisée pour traiter différents types de dermatite (Giner *et al.*, 1988, Da silva, 2004). L'huile essentielle des parties aériennes de cette plante a des propriétés antifongiques et est utilisée dans la parfumerie et les cosmétiques. L'infusion de la santoline a aussi une action insectifuge sur les pucerons, les acariens et les chenilles (Nardo, 2011).

## II.3. Composition chimique

L'étude phytochimique effectuée sur plusieurs espèces de *Santolina* a révélé la présence d'un grand nombre de composés chimiques y compris les huiles essentielles, les flavonoïdes et les terpénoïdes (Giner pons et Rios Canavate, 2000). En 1999, Barrero et ses collaborateurs ont isolé quatre sesquiterpènes. De même, El-sahhar et ses collaborateurs (2011) ont montré que

l'huile essentielle de *Santolina chamaecyparissus* est un complexe mixte contenant 39 composés, dont 22 sont identifiés.

L'huile de *S. chamaecyparissus* est constituée principalement de composés monoterpènes oxygénés riches en curcumène, thujol, oxyde de limonène, bornyl, eucalyptol, époxyde  $\alpha$ -bisabolène, carveol, oxyde de caryophyllène et le camphre. Les autres constituants ne présentent qu'une fraction mineure ; il s'agit du camphène,  $\beta$ -pinène,  $\alpha$ -terpinène, p-cymène, santène triène, hydrate de cis-sabinène, limonène, hydrate de trans-sabinène,  $\alpha$ -terpinéol et farnesol. Les monoterpènes irréguliers fréquemment rencontrés dans les huiles de *Santolina* sont: artemisia cétone qui présente plus de 60% de la composition chimique de l'huile, artemisia alcool, artemisia triène, santolina triène, santolina alcool, yomogi alcool, chrysanthémyle alcool et parfois lavandulol (Pala- Paul *et al.*, 1999; Cherchi *et al.*, 2001). Des flavones comme l'apigénine, la lutéoline ainsi que leurs glucosides, des flavanes méthoxylés comme le pectolinariginine, hispiduline, nepétine et jaceosidine et des flavonoles méthoxylés en position 7 glucosyl ont été aussi isolés à partir de *S. chamaecyparissus* (Giner Pons et Rios Canavate, 2000).

La composition chimique de l'huile essentielle de *S. chamaecyparissus* varie d'une saison à une autre. Ainsi, certains composés comme le limonène, santolina triène,  $\beta$ -pinène, curcummin et carveol disparaissent en été, tandis que d'autres comme l'oxazolidine apparaissent (Elsharkawy, 2014).

Il paraît que les composés phytochimiques les plus répandus dans différentes espèces de ce genre ayant des activités pharmacologiques sont des sesquiterpènes de type eudesmane, de type germacrane et de type farnesane (Sanz *et al.*, 1991; Barrero *et al.*, 1999), des tri-terpènes de type dammarane (Giner Pons et Rios Canavate, 2000), des hétérocycles acétylènes (Ferrari *et al.*, 2005) et des acétylènes de type éther spirokétalenol (Barrero *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 2005).

## II.4. Activités biologiques

Les analyses phytochimiques montrent que *S. chamaecyparissus* renferme un grand nombre de métabolites secondaires responsables des activités biologiques attribuées aux extraits de plantes médicinales (Da Silva, 2004). De ce fait, Elsharkawy (2014) a démontré que cette plante présente une grande importance dans le traitement du cancer de foie. L'huile de *Santolina chamaecyparissus* a une grande cytotoxicité contre le carcinome hépatocellulaire humain. Cela pourrait être dû à la présence de certains composants chimiques tels que le bisbolol et l'oxyde de caryophyllène ayant une activité anticancérogène. Sala et ses collaborateurs (2000) montrent que *S. chamaecyparissus* possède une activité anti-inflammatoire et anti-phospholipase A2 en raison de

la présence du principe actif nepétine dans l'extrait de la plante. Les extraits de cette plante ont réduit significativement l'activité spontanée chez les souris et ont montré un effet analgésique (Giner *et al.*, 1988). Ils ont inhibé *in vitro* les contractions du muscle lisse induites par différents agonistes incluant l'histamine et la sérotonine, comme ils ont induits des effets anti-inflammatoires dans les essais de l'œdème de la patte induit par la carrageenane (Giner *et al.*, 1989). Par ailleurs, son huile essentielle a des propriétés antifongiques (Suresh *et al.*, 1997).

# Partie expérimentale

# Matériel & Méthodes

## I. Matériel

### I.1. Réactifs

Les produits chimiques utilisés dans la présente étude sont tous de grade analytique. Le 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH), l'huile de croton, la  $\lambda$ -carrageenan, l'indométacine, l'aspirine, la ferrosine (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1, 2,4-triazine-4',4'-disulfonic acid sodium salt), le  $\beta$ -carotène, le tween 20, le tween 40, le DMSO, l'acide trichloracétique (TCA), l'acide ethylenediamine tétraacétique (EDTA), le pyrogallol, acide cacodylique, l'acide diéthylènetriaminepentacétique, superoxyde dismutase, le thiocyanate de potassium (KCN), le  $\text{FeCl}_3$ , le réactif de Folin-Ciocalteu, l'acide gallique, l'acide tannique, la quercétine, le ferricyanide de potassium  $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , le paracétamol (PCM), le tétrachlorure chlorure de carbone ( $\text{CCl}_4$ ) et le carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) sont procurés auprès de Sigma (Allemagne). Le chlorure ferreux ( $\text{FeCl}_2$ ), l'acide linoléique et le 2, 6 di-tert-butyl-4-methyl phenol (BHT) sont de la firme Fluka (France). Les sels utilisés pour la préparation des solutions tampons sont obtenus auprès de Panreac (Espagne). Les solvants organiques sont obtenus auprès de Prolabo (France).

### I.2. Matériel végétal

La plante *Santolina chamaecyparissus* (*S. chamaecyparissus*) a été récoltée durant la phase de floraison entre Avril et Mai 2011 de la région d'Ain Oulmène, Sétif. Elle a été identifiée par Pr. Laour Hocine (laboratoire de biologie végétale, université de Sétif). La partie aérienne a été nettoyée, séchée à l'ombre et à température ambiante, broyée puis stockée à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

### I.3. Animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des rats mâles *Albino Wistar* pesant entre 150 et 200 g et des souris *Swiss albinos*, mâles et femelles pesant entre 25 et 30g fournis par l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux repartis en groupes de 6 sont hébergés dans des cages en polypropylène à température ambiante et à cycle naturel de la lumière (avril-juillet), avec accès libre à l'eau et à l'alimentation. Les aliments proviennent de l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) d'El-Ksar –Bejaia. Après une semaine d'adaptation, les animaux sont soumis à jeun pendant une nuit avant traitements.

## II. Méthodes

### II.1. Préparation des extraits de *S. chamaecyparissus*

L'extrait éthanolique de *Santolina chamaecyparissus* (EE) est préparé selon la méthode de Royer et ses collaborateurs (2011) avec de légères modifications. Brièvement, 100 g de la poudre de la partie aérienne de la plante sont mis à une macération dans 1 L d'éthanol/eau (8:2 V/V), sous agitation douce pendant 24 heures à température ambiante. L'extrait hydro-alcoolique est récupéré après 2 filtrations successives. Le filtrat est ensuite évaporé sous pression réduite à 40°C à l'aide d'un rotavapor (BÜCHI) afin d'éliminer le solvant organique. Une poudre brune claire et brillante est obtenue suite au séchage de l'évaporat. L'extrait éthanolique est conservé à -32°C jusqu'à son utilisation.

L'extrait aqueux de *S. chamaecyparissus* (EA) est préparé selon la méthode de Ljubuncic et ses collaborateurs (2005) avec de légères modifications. Brièvement, la poudre de la partie aérienne de *Santolina chamaecyparissus* est bouillie pendant 20 min dans de l'eau distillée avec un rapport de (1/10: P/V). Après filtration, l'extrait récupéré est soumis à une centrifugation (3000 rpm 10 min). Une poudre brune claire est obtenue suite au séchage du surnageant. L'extrait aqueux est conservé à -32°C jusqu'à son utilisation.

### II.2. Analyse phytochimique des extraits de *S. chamaecyparissus*

#### II.2.1. Dosage des polyphénols

La teneur totale en composés phénoliques des deux extraits de *S. chamaecyparissus* est déterminée selon la méthode décrite par Li et ses collaborateurs (2007). Un volume de 500 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 10% dans de l'eau distillée) est ajouté à 100 µl des solutions d'extraits à différentes concentrations (125, 250 et 500 µg/ml). Après 4 minutes, 400 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5% dans de l'eau distillée) sont additionnés. Le mélange réactionnel est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 90 minutes. L'absorbance est lue à 765 nm. La concentration en polyphénols est calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique (20 – 200 µg/ml) et est exprimée en µg d'équivalents d'acide gallique (µg EAG) par milligramme d'extrait) (**figure 6A**).

#### II.2.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes présents dans les extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus* est réalisée par la méthode décrite par Bahorun et ses collaborateurs (1996).

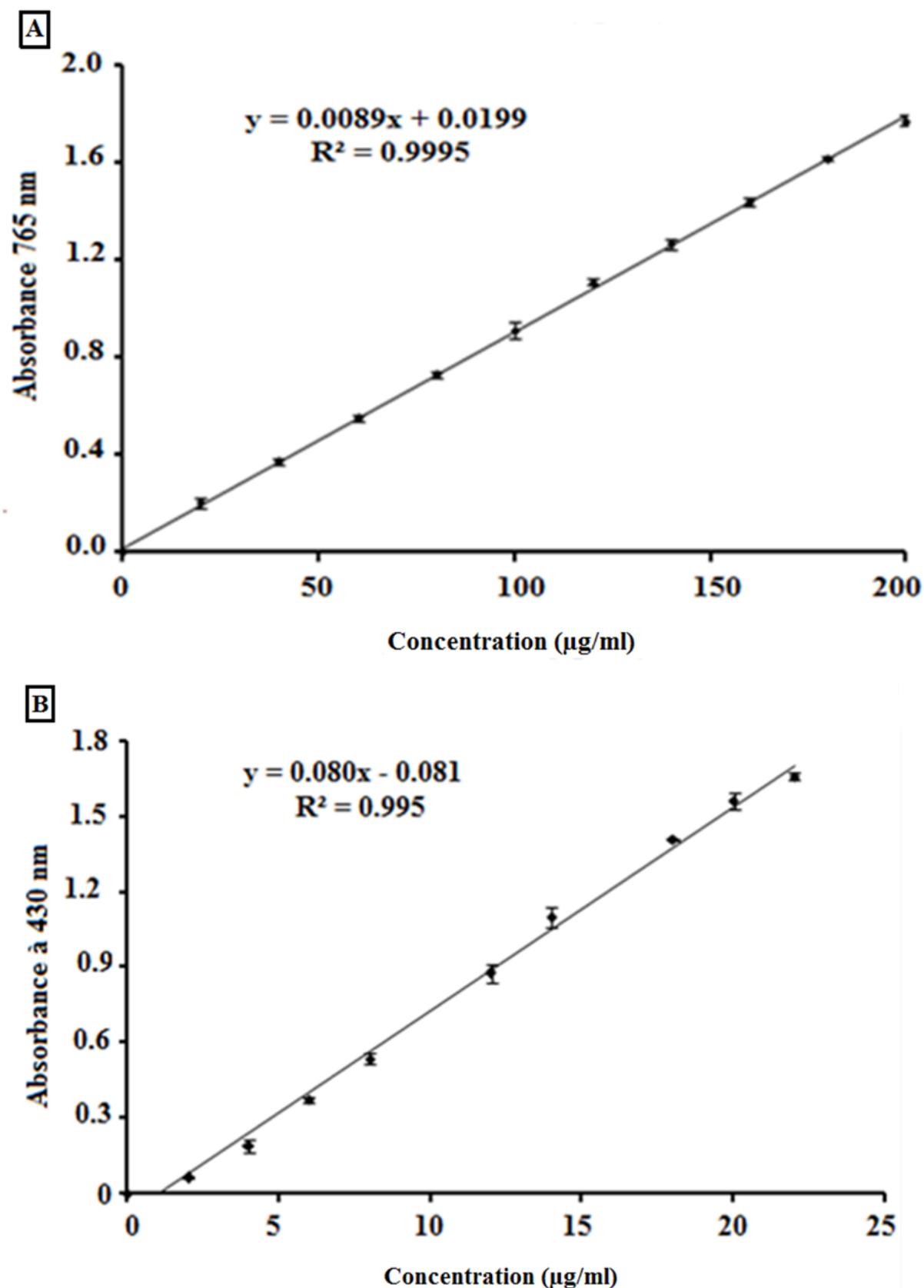
Un volume de 1 ml d'échantillon ou du standard est ajouté à 1 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2% dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 430 nm. La teneur en flavonoïdes est calculée à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (2 – 22  $\mu\text{g/ml}$ ) et est exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine ( $\mu\text{g EQ}$ ) par milligramme d'extrait (**figure 6B**).

### II.2.3. Détermination des composés phénoliques par HPLC/TOF-MS

La détermination des composés phénoliques dans les deux extraits de *S. chamaecyparissus* est effectuée par chromatographie liquide sur colonne à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/TOF-MS) selon la méthode décrite par Demirtaş et ses collaborateurs (2013). Un chromatographe Agilent Technology 1260 couplé à la spectrométrie à temps de vol 6210 avec une colonne de type ZORBAX SB-C18 (4.6 x 100 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) ont été utilisés. Le volume d'injection est de 10  $\mu\text{l}$ . Les deux extraits et les standards sont élués à travers la colonne par une phase mobile avec un débit de 0.6 ml/min à 35°C. Cette phase mobile est constituée de deux solutions ; le premier éluent (A) est composé par de l'acide formique 0.1% préparé dans l'eau pure et le deuxième éluent (B) correspond à l'acetonitrile. L'élué est effectuée en mode gradient comme suit : 0-1 min 10% B; 1-20 min 50% B; 20-23 min 80% B; 23-25 min 10% B; 25-30 min 10% B. L'azote est le gaz vecteur utilisé (325°C, 10.0 L min<sup>-1</sup>, nébuliseur de 40 psi, voltage capillaire de 4000 V et voltage fragmenteur de 175 V). Une solution à 200 ppm de chaque extrait est préparée dans du méthanol à température ambiante. Ensuite, ils sont filtrés à travers une membrane de téflon (Polytétrafluoroéthène PTFE ; 0.45  $\mu\text{m}$ ) en utilisant un injecteur pour éliminer les particules.

### II.3. Evaluation de toxicité des extraits de *S. chamaecyparissus*

La toxicité aigue des deux extraits de *S. chamaecyparissus* est évaluée selon la méthode de Patrick-Iwuanyanwu et ses collaborateurs (2012). En bref, deux doses de 2000 et 4000 mg/Kg d'extrait éthanolique ou aqueux sont administrées par voie orale aux rats mâles sains. Puis l'observation intensive des rats a été effectuée durant les quatre premières heures après l'administration de l'extrait et pendant 14 jours, afin d'apprécier les changements de comportements, les symptômes de toxicité et la mort des animaux.



**Figure 6.** Droite d'étalonnage de la quercétine (A), et de l'acide gallique (B). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions  $\pm$  SD.

## II.4. Activité hépatoprotectrice des extraits *S. chamaecyparissus*

### II.4.1. Induction de l'hépatotoxicité par le CCl<sub>4</sub> le paracétamol chez le rat

L'activité hépatoprotectrice des extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus* est évaluée selon le protocole décrit par Kamisan et ses collaborateurs (2013). Brièvement, les animaux sont subdivisés en 17 groupes de six rats chacun. Les rats du premier, deuxième et troisième groupe reçoivent oralement 10 ml/Kg d'eau distillée quotidiennement pendant 7 jours. Lors du dernier jour, ils reçoivent l'huile d'olive (1 ml/Kg, par voie intrapéritonéale), le tétrachlorure de carbone 50% préparé dans l'huile d'olive (1 ml/Kg par voie intrapéritonéale) et le paracétamol (3 g/Kg, par voie orale), respectivement (Kamisan *et al.*, 2013). Les rats du quatrième et du cinquième groupe constituent les standards; et sont prétraités par le silymarin 100 mg/Kg par voie orale quotidiennement pendant 7 jours avant l'intoxication par le CCl<sub>4</sub> et le paracétamol, respectivement. Les animaux des groupes 6, 7, 8, 9, 10 et 11 reçoivent par voie orale et quotidiennement pendant 7 jours 30, 150 et 300 mg/Kg de l'extrait éthanolique ou aqueux de *S. chamaecyparissus*, respectivement (**tableau 3**). Trois heures après la dernière administration des extraits, 1 ml/Kg de CCl<sub>4</sub> (50%) est injecté par voie intrapéritonéale. Les rats des groupes 12, 13, 14, 15, 16 et 17 reçoivent quotidiennement pendant 7 jours 30, 150 et 300 mg/Kg de l'extrait aqueux et éthanolique, respectivement. Après la prise orale de la dernière dose d'extraits, ces rats reçoivent oralement 3 g/Kg de paracétamol préparé dans le glycérol. Les rats sont sacrifiés par ponction cardiaque 24 h après l'administration du CCl<sub>4</sub> ou du paracétamol. Le foie est immédiatement récupéré, nettoyé avec du NaCl 0.9% stérile et froid.

**Tableau 3.** Protocole d'induction de l'hépatotoxicité par le CCl<sub>4</sub> et le paracétamol

Groupe		Traitement (7 jours)	Hépto-intoxication
1	Témoin		Huile d'olive + eau distillée
2	Contrôle CCl <sub>4</sub>	Eau distillée	Huile d'olive + CCl <sub>4</sub>
3	Contrôle PCM		PCM 3g/kg
4	Silymarin + CCl <sub>4</sub>		Huile d'olive + CCl <sub>4</sub>
5	Silymarin + PCM	Silymarin (100 mg/kg)	PCM 3g/kg
6		EA 30 mg/kg	
7	EA + CCl <sub>4</sub>	EA 150 mg/kg	
8		EA 300 mg/kg	
9		EE 30 mg/kg	Huile d'olive + CCl <sub>4</sub>
10	EE + CCl <sub>4</sub>	EE 150 mg/kg	
11		EE 300 mg/kg	
12		EA 30 mg/kg	
13	EA + PCM	EA 150 mg/kg	
14		EA 300 mg/kg	
15		EE 30 mg/kg	PCM 3g/kg
16	EE + PCM	EE 150 mg/kg	
17		EE 300 mg/kg	

## **II.4.2. Analyses biochimiques**

Le taux de : l'alanine transaminase (ALAT), l'aspartate transaminase (ASAT), la phosphatase alcaline (ALP), la bilirubine, les protéines totaux, l'albumine, la lactate déshydrogénase (LDH), le cholestérol, les triglycérides, l'urée et la créatinine est déterminé dans le plasma à l'aide d'un automate COBAS INTEGRA utilisant les réactifs Roche.

## **II.4.3. Dosage des catalase, SOD et MDA**

Pour le dosage des enzymes antioxydantes (catalase et superoxyde dismutase) et du malondialdéhyde, un poids de 500 mg de foie dans 5 ml de tampon phosphate froid ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM, pH 7.4) est broyé à l'aide d'un Broyeur IKA-RW15. L'homogénat obtenu est centrifugé à 4000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant est aliquoté dans des eppendorfs puis conservé à -32 °C jusqu'à son utilisation.

### **II.4.3.1. Activité catalase**

La catalase est une enzyme catalysant la décomposition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$ . Cette décomposition peut être suivie par diminution de l'absorbance à 240 nm. La détermination de l'activité de la catalase est effectuée selon le protocole décrit par Aebi et ses collaborateurs (1974). Brièvement, 34  $\mu\text{l}$  de surnageant dilué au 1/10 est ajouté directement dans la cuve contenant 966  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 19.5 mM préparé dans le tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7). La lecture est faite contre un blanc contenant le surnageant de foie et le tampon phosphate de sodium uniquement en utilisant un spectrophotomètre UV/VIS (SPECORD 210 PLUS). L'activité de la catalase est exprimée en  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  de protéines.

### **II.4.3.2. Activité SOD**

La superoxyde dismutase (SOD) est une métallo-enzyme catalysant la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. La détermination de l'activité de la SOD est effectuée selon la technique décrite par Marklund et Marklund (1974). Le principe du dosage est basé sur une compétition entre la réaction d'auto-oxydation du pyrogallol par les radicaux  $\text{O}_2^-$  et la dismutation de ces radicaux par la SOD. Brièvement, à 25  $\mu\text{l}$  de la SOD (36 - 357 ng/ml) ou de surnageant de foie sont ajoutés 935  $\mu\text{l}$  de tampon constitué de 50 mM Tris et de 1 mM d'acide diéthylènetriaminepentacétique (DTPA), le pH du tampon doit être amené entre 8.6 et 8.7 avec l'acide cacodilyque. Ce pH induit une variation de l'absorbance du pyrogallol comprise entre 0.030 et 0.031/min. Après homogénéisation, 40  $\mu\text{l}$  de pyrogallol (10

mM) préparé dans du HCl 0.01N sont ajoutés au milieu réactionnel. Après homogénéisation, l'enregistrement de l'absorbance est lancé 45 secondes après l'addition du pyrogallol à une longueur d'onde de 420 nm pendant 1 minute.

L'activité de la SOD est exprimée en unité par milligramme de protéine où l'unité est calculée comme suit :

$$U = (\text{pourcentage d'inhibition}/50) \times \text{le facteur de dilution}$$

Le pourcentage d'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol est calculé selon la formule suivante.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Absorbance contrôle} - \text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance contrôle}}$$

Absorbance contrôle correspond à la laborbance du pyrogallol seul (absorbance maximale)

Absorbance de l'échantillon correspond l'absorbance du pyrogallol en présence de la SOD ou du surnageant du foie.

#### II.4.3.3. Dosage du MDA

Le malondialdéhyde (MDA) est le marqueur le plus utilisé pour étudier la lipoperoxydation. Le dosage de l'MDA est effectué selon le protocole décrit par Mihara et Uchiyama (1978). Brièvement, 125 µl de surnageant de foie est ajouté à 125 µl de TCA (20%) et 250 µl de TBA (0.67%). Le mélange réactionnel est chauffé à 100 °C pendant 15 min. Après refroidissement rapide, 1 ml de n-butanol est ajouté. Le milieu réactionnel subit une forte agitation ensuite une centrifugation pendant 15 min à 3000 rpm. L'absorbance du surnageant est lue à 530 nm contre un blanc contenant de l'eau distillée à la place du surnageant. La concentration en MDA en nM est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA - TBA ( $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) à 532 nm.

#### II.4.4. Etude histologique

Des portions de taille moyenne de foie sont fixés dans le formol 10% pendant 48 h. Après fixation, elles sont déshydratées progressivement dans l'éthanol (70-75%, 90-95% et 100%) à l'aide de deux automates TISSUE-TEKII et LEICA TP 1020. L'inclusion dans la paraffine est réalisée dans des moules métalliques par l'intermédiaire de l'automate d'inclusion (LEICA EG 1160). Les blocs paraffinés obtenus sont ensuite coupés par un microtome (LEICA RM 2235) en coupes de 5 µm d'épaisseur. Ces dernières sont étalées sur des lames et séchées pendant une heure à 37°C, réhydratées, colorées à l'hématoxyline-éosine à l'aide de l'automate de coloration (LEICA ST 4040). L'observation des coupes histologiques est effectuée sous microscope

optique (LEICA DM 1000) doté d'un appareil photo intégré (LEICA DFC 495) numérisé et du logiciel LEICA LAS. V.3.8.

## II.5. Activités anti-oxydantes des extraits de *S. chamaecyparissus*

### II.5.1. Test de DPPH

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus* vis-à-vis du DPPH est effectuée selon la méthode décrite par Que et ses collaborateurs (2006). Un volume de 1 ml de la solution de DPPH (0.1 mM préparé dans le méthanol) est ajouté à 1 ml d'extrait à différentes concentrations (5 - 500 µg/ml). Le BHT est utilisée comme antioxydant standard. Le mélange réactionnel est incubé 30 min à l'obscurité et à température ambiante, puis l'absorbance est lue à 517 nm. Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire est calculé selon la formule suivante:

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = 100 \times \left( \frac{A_c - A_e}{A_c} \right)$$

**A<sub>c</sub>** : absorbance du contrôle.

**A<sub>e</sub>** : absorbance de l'échantillon test.

La concentration effectrice (EC<sub>50</sub>) est définie comme étant la concentration de l'échantillon qui induit 50% d'effet piègeur du radical DPPH.

### II.5.2. Test de blanchiment de β-carotène

La capacité des deux extraits de *S. chamaecyparissus* de prévenir la décoloration de la β-carotène est vérifiée par la méthode décrite par Bougatef *et al.* (2009). Brièvement, 50 µl d'acide linoléique est ajouté à 400 mg de tween-40. Par la suite, 2 ml de chloroforme et 1 mg de β-carotène sont ajoutés au mélange. Le chloroforme est évaporé sous vide à 45°C, ensuite 200 ml d'eau distillée sont ajoutés et le milieu réactionnel est vigoureusement agité. Un volume de 5 ml de l'émulsion contenant la β-carotène-acide linoléique est transféré dans des tubes contenant 1 ml d'extrait de plante (2 mg/ml) ou de BHT (2 mg/ml). Ces tubes sont fermés puis incubés dans un bain marie à 50 °C pendant 2 heures. Une fois l'émulsion est ajoutée, l'absorbance est lue à 470 nm. Cette lecture correspond au temps zéro. La lecture d'absorbance est poursuivie chaque 15 min contre un blanc contenant l'acide linoléique, tween-40, eau distillée oxygénée et l'extrait.

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = \left( 1 - \frac{A_{0e} - A_{120e}}{A_{0c} - A_{120c}} \right)$$

$A_{0e}/A_{0c}$  et  $A_{120e}/A_{120c}$  sont les absorbances des échantillons et des contrôles mesurées au temps 0 et 120 min, respectivement.

### II.5.3. Chélation du fer ferreux

L'activité chélatrice des extraits de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* a été évaluée selon la méthode décrite par Le et ses collaborateurs (2007). Le mélange réactionnel (800  $\mu$ l) est constitué par : 700  $\mu$ l d'extrait aqueux ou éthanolique à différentes concentrations (0.025 – 1.2 mg/ml), 50  $\mu$ l de  $\text{FeCl}_2$  (0.6 mM préparé dans l'eau distillée). Ce mélange est vigoureusement agité et laissé réagir pendant 5 min avant d'ajouter 50  $\mu$ l de la ferrozine (4.75 mM préparée dans le méthanol 80%). Une seconde fois, le mélange est bien agité puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la complexation du fer résiduel avec la ferrozine. Ce complexe est un chromophore rouge ayant un maximum d'absorption à 562 nm. L'absorbance est lue contre le contrôle préparé de la même façon à l'exception d'extrait qui est remplacé par le méthanol. L'activité chélatrice (%) est calculée selon la formule suivante:

$$\text{Effet chélateur (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{A_e}{A_c}\right)$$

$A_c$  est l'absorbance du contrôle (sans extrait) et  $A_e$  est l'absorbance en présence d'extrait. La concentration d'extrait nécessaire pour atteindre 50% de l'effet chélateur ( $\text{IC}_{50}$ ) est calculée à partir d'analyse de régression non linéaire.

### II.5.4. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits de *S. chamaecyparissus* est déterminé selon la méthode décrite par Bougateg *et al.*, (2009). Le principe est basé sur la mesure de l'absorbance du complexe bleu de Perl's Prussian formé suite à l'addition d'un excès de  $\text{Fe}^{3+}$ . Dans ce test, tous les produits chimiques et les deux extraits de la plante sont préparés dans du tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6). Un volume de 625  $\mu$ l des extraits ou du standard (BHT) à concentrations croissantes est ajouté à 625  $\mu$ l de  $\text{K}_2\text{FeCN}_6$  (1%). Le milieu réactionnel est incubé par la suite à 50°C pendant 20 min. La réaction chimique est stoppée par l'ajout de 625  $\mu$ l d'acide trichloroacétique 10%, ensuite un volume de 625  $\mu$ l de surnageant, obtenu suite à la centrifugation (2500 rpm/10 min) est mélangé avec 625  $\mu$ l d'eau distillée et 125  $\mu$ l de  $\text{FeCl}_3$  (0.1%). L'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc contenant le tampon phosphate.

### II.5.5. Test de scission des brins d'ADN

L'activité préventive des extraits aqueux et éthanolique de *Santolina chamaecyparissus* contre l'endommagement de l'ADN est testée sur le plasmide M13+ pBluescript. L'ADN plasmidique est isolé par l'utilisation du kit Qiagene plasmid miniprep. L'oxydation de l'ADN plasmidique est ensuite effectuée par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et les rayonnements UV en présence et en absence des différentes concentrations (100, 250, 350 et 500 µg/ml) d'extraits. Cette étape est vérifiée sur gel d'agarose (1%) selon le protocole modifié de Attaguile et ses collaborateurs (2000).

Les manipulations sont effectuées avec un volume de 10 µl dans un tube de microcentrifugation contenant 200 ng d'ADN plasmidique préparé dans un tampon phosphate (7.14 mM phosphate et 14.29 mM NaCl, pH 7.4). Le peroxyde d'hydrogène est ajouté à une concentration finale de 2.5 mM, avec ou sans 1 µl d'extrait à différentes concentrations (100, 250, 350 et 500 µg/ml). Les réactions sont initiées par l'irradiation UV pendant 5 minutes sur la surface d'un transilluminateur UV avec une intensité de 8000 µW/cm<sup>2</sup> à 300 nm à température ambiante. Après irradiation, le mélange réactionnel (10 µl) avec du gel contenant un colorant est placé sur un gel d'agarose (1%) pour électrophorèse. L'électrophorèse est réalisée à 40 V pendant 3 h en présence de bromure d'éthidium (10 mg/ml). L'ADN plasmidique pBluescript M13+ non traitée est utilisé comme témoin dans chaque essai d'électrophorèse. De même, de l'ADN plasmidique traité partiellement (UV seulement ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seulement) est utilisé sur chaque essai. Le pourcentage d'inhibition de la scission des brins d'ADN est calculé comme suit:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \left( \frac{P1 - Pt}{P2 - Pt} \right)$$

P1 est le pourcentage d'ADN surenroulé restant après le traitement par l'UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence des extraits;

Pt est le pourcentage d'ADN surenroulé restant dans le plasmide témoin non traité;

P2 est le pourcentage d'ADN surenroulé restant après le traitement par l'UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en absence des extraits.

L'analyse densitométrique des bandes d'ADN est effectuée par un système de documentation Gel (Gel-Doc-XR, BioRad, Hercules, CA, USA). Ensuite, ces bandes sont quantifiées par le programme Discovery Series Quantity One (version 4.5.2, BioRad Ca. USA).

### II.5.6. Test d'oxydation des protéines

L'évaluation de la capacité protectrice des extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus* contre l'oxydation des protéines par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Fe<sup>3+</sup>/acide ascorbique est

effectuée selon la méthode décrite par Kizil et ses collaborateurs (2011). Brièvement, la BSA (1 mg/ml) est préparée dans un tampon phosphate de potassium (20 mM, pH 7.4), puis 50  $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub>, 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M acide ascorbique sont ajoutés au mélange réactionnel et est incubé en présence ou en absence des extraits à différentes concentrations (de 50 à 1000  $\mu$ g/ml). Le volume final est 1.2 ml. Après une incubation de 3 h à 37°C, le mélange réactionnel est analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant 10% SDS, selon la méthode de Laemmli (1970). Les échantillons sont mélangés avec des volumes égaux du tampon d'échantillon (Tris HCl pH 6.8, SDS 2%, 2-mercaptoéthanol 5%, sucrose 10%, et bleue de bromophénol 0.002%). Le mélange est ensuite porté à ébullition pendant 5 min et 5  $\mu$ l de chaque échantillon sont transférés dans les puits. Le gel est mis dans un réservoir BioRad rempli d'un tampon de migration (25 mM Tris pH 8.3, 190 mM glycine et 0.1% SDS) à une tension maximale et un courant constant de 25 mA pour un mini-gel, en utilisant une alimentation Bio Rad 1000/500. Les gels sont colorés avec le bleu de Coomassie (0.15%) pendant 2 h et numériquement photographié.

Pour déterminer le taux des endommagements de l'albumine, l'intensité de la bande est estimée par l'intermédiaire du système de gel de Documentation (Gel-Doc-XR, BioRad, Hercules, CA, USA). Les bandes sont quantifiées par le logiciel Discovery Series Quantity One programme (version 4.5.2, BioRad, Ca, USA). La densité de chaque bande est estimée par rapport au groupe témoin.

## **II.6. Activités anti-inflammatoires des extraits de *S. chamaecyparissus***

### **II.6.1. Activités anti inflammatoires *in vivo***

#### **II.6.1.1. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton**

L'évaluation de l'effet anti-œdémateux du traitement local par les extraits éthanolique et aqueux de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* est effectuée selon la méthode décrite par Manga et ses collaborateurs (2004). Brièvement, l'inflammation cutanée de la face interne de l'oreille des souris du groupe témoin est induite par l'application de 15  $\mu$ l d'acétone – eau (1 :1 v/v) contenant 80  $\mu$ g d'huile de croton. L'indométacine (0.5 mg/oreille) et les extraits testés (2 mg/oreille) sont dissouts dans le mélange acétone – eau contenant l'huile de croton ; et sont appliqués sur la face interne de l'oreille. Après 4h, l'épaisseur de l'oreille est mesurée par un pied à coulisse digital. La différence de l'épaisseur avant et après l'application de l'huile de croton est calculée. L'activité anti-inflammatoire est exprimée en pourcentage d'inhibition de l'œdème chez les souris traitées en comparaison avec les souris du groupe témoin.

$$\text{Activité anti - inflammatoire (\%)} = 100 \times \left( \frac{\Delta \text{ épaisseur t} - \Delta \text{ épaisseur e}}{\Delta \text{ épaisseur t}} \right)$$

$\Delta$  épaisseur t : différence de l'épaisseur du groupe témoin (4h- 0h)

$\Delta$  épaisseur e : différence de l'épaisseur du groupe échantillon (4h- 0h).

### II.6.1.2. Poche d'air

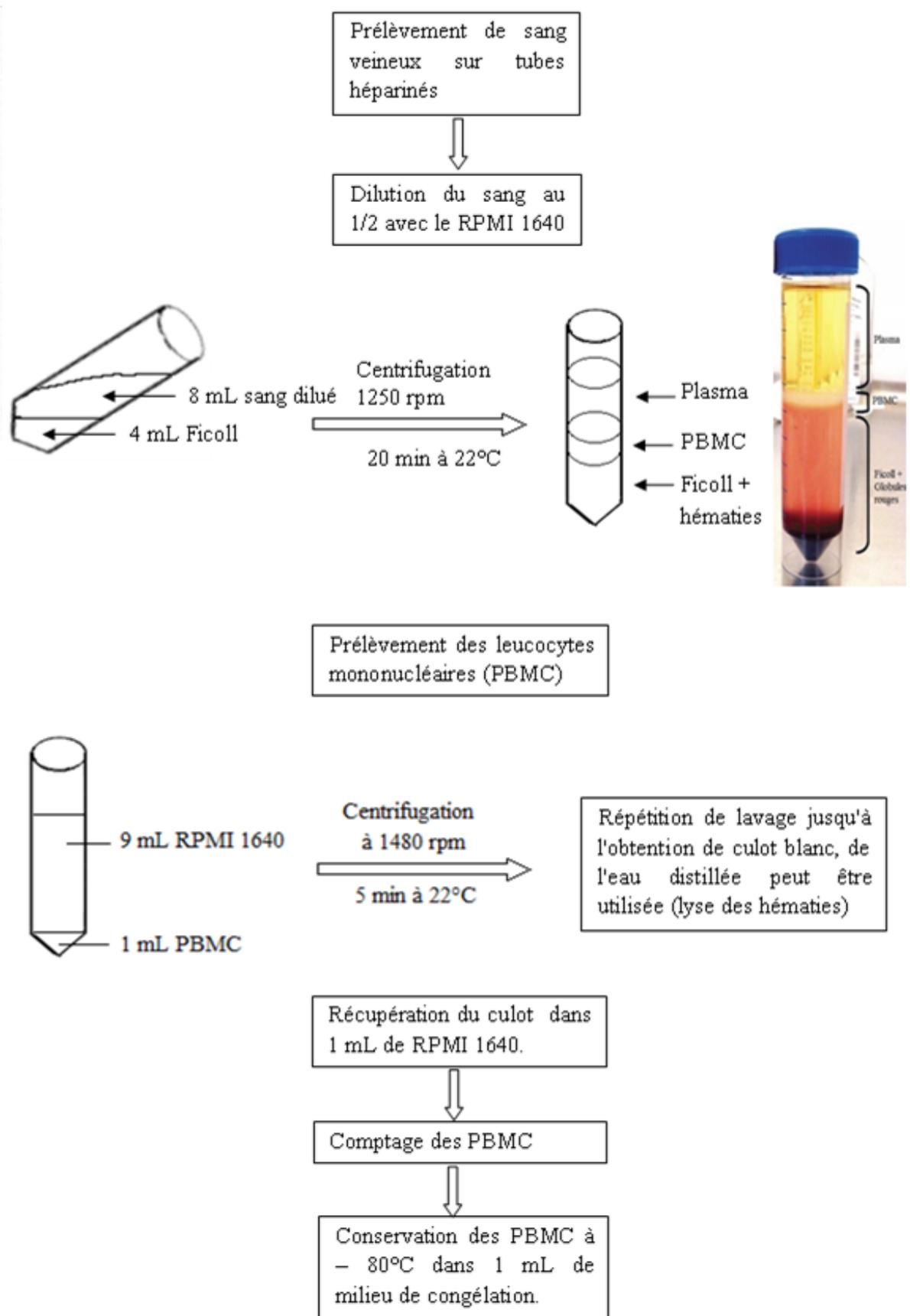
L'induction de la poche d'air est réalisée chez des souris selon la méthode décrite par Liz et ses collaborateurs (2011) par l'injection de 3 et 1.5 ml d'air stérile lors de la première et la troisième journée de l'expérience, respectivement. Lors de la 7<sup>ème</sup> journée, les souris reçoivent directement dans la poche d'air 1 ml de NaCl stérile (0.9%), l'extrait aqueux ou éthanolique (1 mg/ml) et l'indométacine 0.1 mg/ml une heure avant l'induction de l'inflammation aigue par l'injection directe dans la poche d'air de la  $\lambda$ -carrageenan (1%). Tous les produits chimiques et les extraits de plante sont préparés dans le NaCl 0.9% stérile. Quatre heures après l'induction de l'inflammation, les souris sont sacrifiées puis fixées sur une table chirurgicale et une incision dans la peau du dos a été faite pour percer la poche d'air. La cavité est ensuite lavée avec 1 ml de NaCl stérile contenant de l'héparine (20 UI/ml) et le nombre de leucocytes ayant migrés vers la poche d'air est calculé à l'aide d'une cellule Thoma sous microscope optique.

## II.6.2. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

### II.6.2.1. Effet des extraits *S. chamaecyparissus* sur la libération des cytokines

#### A/ Isolement des leucocytes mononucléaires

L'isolement des mononucléaires périphériques est effectué selon le protocole décrit par Amro et ses collaborateurs 2013. Le sang récupéré dans des tubes héparinés à partir de sujets sains et non fumeurs est dilué au 1/2 avec le milieu de culture RPMI 1640. Dans un tube conique de 15 ml, un volume de 4 ml de Ficoll est déposé à l'intérieur du tube, ensuite 8 ml de sang dilué est ajouté prudemment au dessus de la couche de Ficoll à l'aide d'une pipette. Les tubes sont centrifugés à 1250 rpm/20 min à 22°C. Les leucocytes mononucléaires se séparent dans la phase qui se situe juste en dessus du culot et en dessous du plasma (**figure 7**). Cette phase est récupérée à l'aide d'une pipette stérile dans un tube conique de 15 ml, puis un volume de 9 ml de RPMI est ajouté; et le mélange est centrifugé à 1480 rpm pendant 5 minutes à 22°C. Cette étape est répétée deux ou trois fois. Les globules rouges sont éliminés par l'ajout de 1 ml d'eau distillée pendant



**Figure 7.** Technique d'isolement des leucocytes mononucléaires périphériques (PBMCs).

30 secondes, ensuite 9 ml de milieu de culture (RPMI 1640) est ajouté. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot blanc est récupéré dans 1 ml de RPMI 1640.

### **B/ Comptage et conservation des leucocytes mononucléaires**

Le comptage des PBMC est effectué par la cellule de Neubauer; à 50 µl de suspension cellulaire, 50 µl de bleu de Trypan 0.4% est ajouté.

Pour être conservés, les mononucléaires récupérés subissent une centrifugation à 1480 rpm pendant 5 minutes à 22°C. Le surnageant est éliminé et 1 ml de milieu de congélation (10 ml de la solution stock de sérum bovin fœtal 12.5%, 10 ml de RPMI-1640 et 5 ml de DMSO) est ajouté au culot de cellules. Les PBMC sont conservées à - 80°C.

### **C/ Culture des leucocytes mononucléaires**

Pour une décongélation rapide, les cryoflacons contenant les monocytes sont mis dans une étuve à 37°C. Une fois décongelés, des gouttes de milieu de culture complet (RPMI-1640 + sérum bovin fœtal 10% + antibiotique 0.5%) sont ajoutées. Le contenu de chaque cryoflacon est transmis dans un tube stérile contenant 8 ml de RPMI-1640 complet tiède. Le milieu de congélation et le milieu de culture complet sont éliminés par centrifugation (1200 rpm/10 min à 22°C). Les cellules sont récupérées dans le RPMI complet. Le nombre des monocytes est déterminé par la cellule de Neubauer, puis la culture de ces cellules est réalisée dans des micro-plaques de 24 puits. A 1 ml de suspension cellulaire ( $4 \times 10^5$  cellules/puit), 600 µl de concanavalin A (5 µg/ml) et 400 µl d'extrait de la plante à différentes concentrations (1, 10, 50 et 100 µg/ml) sont ajoutés. Les puits contrôles ne contiennent pas d'extrait. Après une incubation des micro-plaques à 37°C dans une étuve à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 18 heures, le surnageant est récupéré par centrifugation (1200 rpm/10 min à 22°C) et conservé à - 80°C.

### **D/ Dosage des cytokines libérées par les leucocytes mononucléaires**

L'IL-1β, l'IL-8, l'IL-10 et le TNFα sont dosés dans le surnageant par des kits ELISA (ebioscience). Brièvement, les anticorps de capture des cytokines sont ajoutés dans les puits des micro-plaques d'ELISA et incubés pendant une nuit. Après 24 h, plusieurs lavages sont effectués afin d'éliminer les anticorps n'ayant pas été fixé sur les parois des puits. La cytokine standard servant à établir une gamme d'étalonnage est ajoutée au puits standards à des concentrations décroissantes. Le surnageant des leucocytes mononucléaires est ajouté aux autres puits de la micro-plaque d'ELISA. L'incubation s'effectue à 4°C pendant une nuit. Après 24 h, plusieurs lavages sont effectués afin de s'en débarrasser des cytokines n'ayant pas été fixé sur les anticorps

de capture. Les anticorps de détection couplés à l'enzyme sont ajoutés une heure avant la réalisation des lavages. Ensuite, le substrat de l'enzyme est ajouté au milieu réactionnel et laisser agir pendant 30 min à l'obscurité. La solution acide est ajoutée pour arrêter la réaction. La lecture s'effectue par un lecteur de micro-plaque à deux longueurs (450 nm et 570 nm).

### II.6.2.2. Activité antihémolytique des extraits *S. chamaecyparissus*

L'activité stabilisante de la membrane plasmique des deux extraits de la plante est évaluée en utilisant la technique d'hémolyse induite par un milieu hypotonique selon Debnath et ses collaborateurs (2013) avec de légères modifications. Brièvement, un prélèvement sanguin est réalisé sur des tubes à EDTA. Le sang est centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. Après trois lavages, une suspension d'érythrocytes humains (10%, V/V) est préparée avec une solution tampon isotonique (tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4, NaCl 0.9%). Les tubes échantillons renferment 100 µl de la suspension érythrocytaire mélangée avec 1 ml d'extrait aqueux, éthanolique (1 mg/ml) ou d'acide acetylsalicylique (0.1 mg/ml) préparé dans un milieu hypotonique (tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7.4 ; NaCl, 0.29%). Le tube témoin contient 100 µl de la suspension érythrocytaire mélangée avec 1 ml de la solution hypotonique. Le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante puis centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. L'absorbance du surnageant est lue à 540 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse est calculé en utilisant la formule:

$$\text{Inhibition de l'hémolyse (\%)} = 100 \times \left( \frac{At - Ae}{At} \right)$$

At: absorbance du témoin, As : absorbance des échantillons.

## III. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD, tandis que ceux effectués *in vivo* sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les valeurs de la concentration effective à 50% sont calculées par la régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. L'analyse de variance est effectuée par le test d'ANOVA one way (univariée) suivie par le test de Dunnett pour les comparaisons multiples, en utilisant le logiciel de Graph Pad. Prism.V5.00. La différence est considérée statistiquement significative au seuil de 5% ( $p < 0.05$ ).

# Résultats

## 1. Extraction

La méthode de macération utilisée pour la préparation de l'extrait éthanolique donne une poudre brune jaunâtre brillante avec un rendement de 15.07%. Tandis que, l'extrait aqueux préparé par décoction donne une poudre brune jaunâtre pâle avec le même rendement (15.77%).

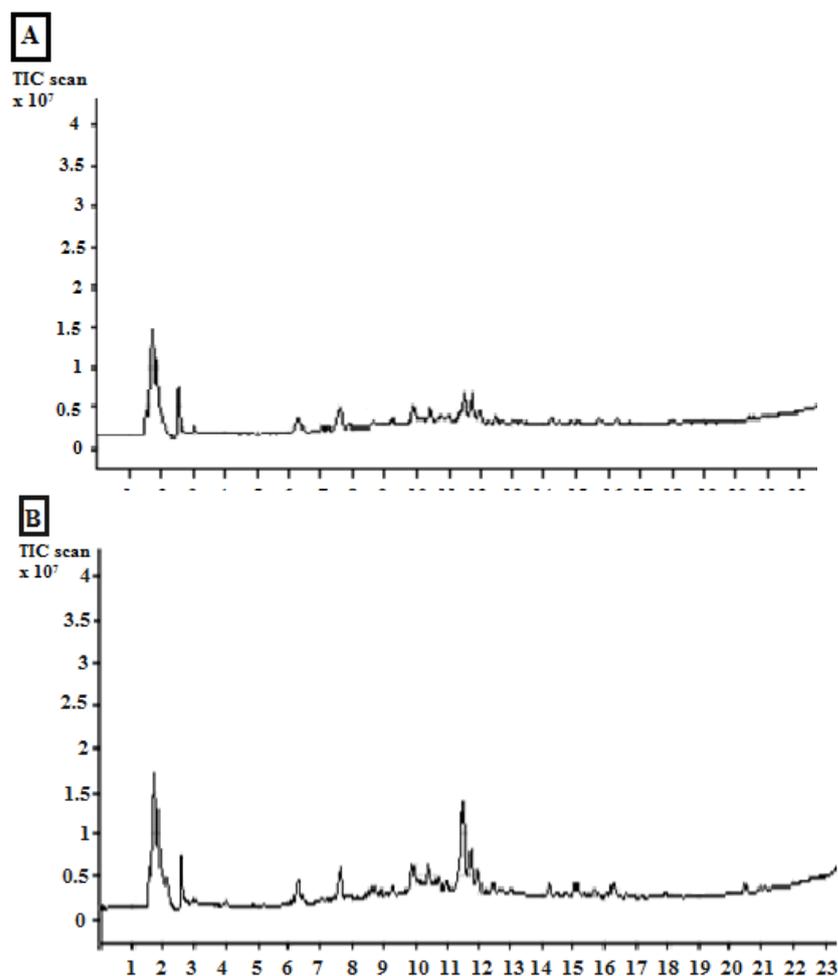
## 2. Analyse phytochimique

Le dosage des polyphénols selon la méthode au Folin-Ciocalteu montre que l'EA et l'EE renferment  $86.14 \pm 2.30$  et  $108.61 \pm 2.55$   $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait respectivement. Le taux des flavonoïdes, constituant la majeure classe des polyphénols, est déterminé selon la méthode au trichlorure d'aluminium. Les résultats révèlent que l'EA et l'EE contiennent  $17.10 \pm 0.76$  et  $23.29 \pm 1.59$   $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait, respectivement. Ces résultats indiquent que l'extrait éthanolique est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait aqueux.

L'analyse quantitative par l'HPLC-TOF/MS révèle la présence des acides phénoliques et des flavonoïdes dans les deux extraits de *S. chamaecyparissus*. Les profils HPLC-TOF/MS des deux extraits apparaissent assez proches (**figure 8**). L'EA et l'EE contiennent l'acide chlorogénique comme constituant majeur avec une teneur de 1958.21 et 2726.57 mg/Kg de la plante, respectivement. Tandis que, l'apigénine-7-glucoside est détectée comme étant le flavonoïde majeur des deux extraits aqueux et éthanolique, avec une teneur de 42.44 et 66.63 mg/Kg de plante, respectivement (**tableau 4**).

## 3. Toxicité des extraits de *S. chamaecyparissus*

Suite à l'administration par voie orale de 2000 et 4000 mg/Kg de l'EA et de l'EE, les rats males sont observés individuellement pendant la première heure et régulièrement pendant les 14 jours. Les rats n'ont montré aucun symptôme de toxicité (changement de comportement, respiration, consommation d'eau et de nourriture, chute de poils...etc.). Cependant, une augmentation considérable dans le gain du poids corporel est observée. En effet, les rats traités par 2000 et 4000 mg/Kg d'EA et d'EE ont fait un gain de poids de 36.14 - 40.32 g deux semaines après l'administration orale des extraits. Tandis que les rats témoins ont fait un gain de  $8.41 \text{ g} \pm 2.15$ . Par conséquent, ces deux extraits semblent être non toxique jusqu'à la dose de 4000 mg/Kg.



**Figure 8.** Chromatogramme de l'HPLC-TOF/MS de l'extrait aqueux (A) et éthanolique (B) de *Santolina chamaecyparissus*.

**Tableau 4.** Composés phénoliques identifiés par HPLC-TOF-MS dans l'extrait aqueux et éthanolique de *Santolina chamaecyparissus*.

Composé	Temps de Rétention (min)	mg/Kg (plante)	
		EASC	EESC
Acide gallique	2.644	2.72	3.6
Acide gentisique	4.297	33.18	19.52
Acide chlorogénique	6.228	1958.21	2726.57
Acide 4-hydroxybenzoïque	6.463	28.09	51.91
Acide protocatechique	6.891	3.29	1.87
Acide cafféique	7.667	31.68	43.64
Acide vanillique	7.741	10.19	/
Rutine	9.972	11.84	10.28
Acide cichorique	10.088	/	2.22
Acide ferulique	10.838	3.02	0.96
Apigénine-7-glycoside	11.678	42.44	66.63
Acide salicylique	13.534	/	2.33
Quercétine	15.165	3.66	11.95
Kampférol	17.727	/	1.05

## 4. Activité hépatoprotectrice de *S. chamaecyparissus*

Dans le but d'évaluer les propriétés hépatoprotectrices des deux extraits de *Santolina chamaecyparissus*, les rats reçoivent quotidiennement ces extraits par voie orale pendant 7 jours. Ensuite, l'hépatotoxicité est induite par l'injection intra-péritonéale du tétrachlorure de carbone ou par administration orale du paracétamol.

### 4.1. Effets de *S. chamaecyparissus* sur les paramètres biochimiques

Les résultats indiquent que l'injection intra-péritonéale du  $\text{CCl}_4$  et l'administration orale du paracétamol induisent une augmentation hautement significative ( $p < 0.001$ ) des taux des transaminases sériques, de la phosphatase alcaline, du lactate déshydrogénase et de la bilirubine totale (**tableau 5**) par rapport aux animaux témoins normaux. Ces résultats reflètent la lésion du tissu hépatique. Cependant, le traitement avec différentes concentrations (30, 150 et 300 mg/Kg) d'extraits éthanolique et aqueux de *S. chamaecyparissus* réduit très significativement le taux de ces paramètres biochimiques par rapport aux groupes contrôles intoxiqués par le  $\text{CCl}_4$  et le paracétamol.

#### 4.1.1. Effet sur les transaminases

Dans le cas de l'hépatotoxicité induite par le  $\text{CCl}_4$ , les deux extraits de *S. chamaecyparissus* induisent une diminution du taux sérique de l'ALT. Une légère différence est remarquée entre l'effet exercé par les deux extraits. Une diminution de  $71.38 \pm 6.20\%$  est observée lors du traitement avec 300 mg/Kg d'EA. L'effet inhibiteur exercé par les deux extraits sur l'ALT est très proche de celui exercé par le silymarin, utilisé comme hépatoprotecteur standard (**figure 9A**).

Dans le modèle de l'hépatotoxicité induite par le paracétamol, les deux extraits réduisent le taux de l'ALT d'une manière hautement significative ( $p < 0.001$ ). En effet, l'EA à 150 mg/Kg exerce l'effet inhibiteur le plus puissant estimé à  $83.55 \pm 2.18\%$  (**tableau 6**).

Le taux de l'AST est réduit d'une manière trop significative ( $p < 0.001$ ) par les deux extraits de *S. chamaecyparissus* (**figure 9B**). Cependant, l'effet exercé par ces extraits n'est pas dose dépendante. En effet, dans les deux modèles d'hépatotoxicité ( $\text{CCl}_4$  et PCM), la dose de 150 mg/Kg représente la dose la plus efficace. Ainsi, l'extrait aqueux à cette dose fait diminuer le taux de l'AST de  $72.31 \pm 3.65\%$  et  $67.78 \pm 2.72\%$ , tandis que l'extrait éthanolique diminue le taux de cette enzyme de  $69.78 \pm 5.33\%$  et  $65.29 \pm 5.10$ , respectivement (**tableau 6**). Cet effet est un plus faible que celui exercé par le silymarin.

**Tableau 5.** Effet du CCl<sub>4</sub> et du paracétamol sur les paramètres biochimiques. Le CCl<sub>4</sub> 50% (1 ml/Kg) est injecté par voie intra-péritonéale, tandis que le paracétamol (3 g/Kg) est administré aux rats par voie orale.

	Témoin	CCl <sub>4</sub>	PCM
ALT (UI/l)	92.35 ± 24.68	764.10 ± 100.64 ***	1796.90 ± 141.23 ***
AST (UI/l)	232.08 ± 88.78	2004.20 ± 170.88 ***	2266.14 ± 416.86 ***
ALP (UI/l)	147.93 ± 11.74	407.24 ± 30.59 ***	237.23 ± 11.97 **
LDH (UI/l)	365.50 ± 40.15	2660.18 ± 332.52 ***	1896.28 ± 401.62 **
Bilirubine totale (mg/l)	0.45 ± 0.06	11.52 ± 2.11 ***	1.58 ± 0.35 *

Les valeurs présentées sont la moyenne ± SEM (n = 6).

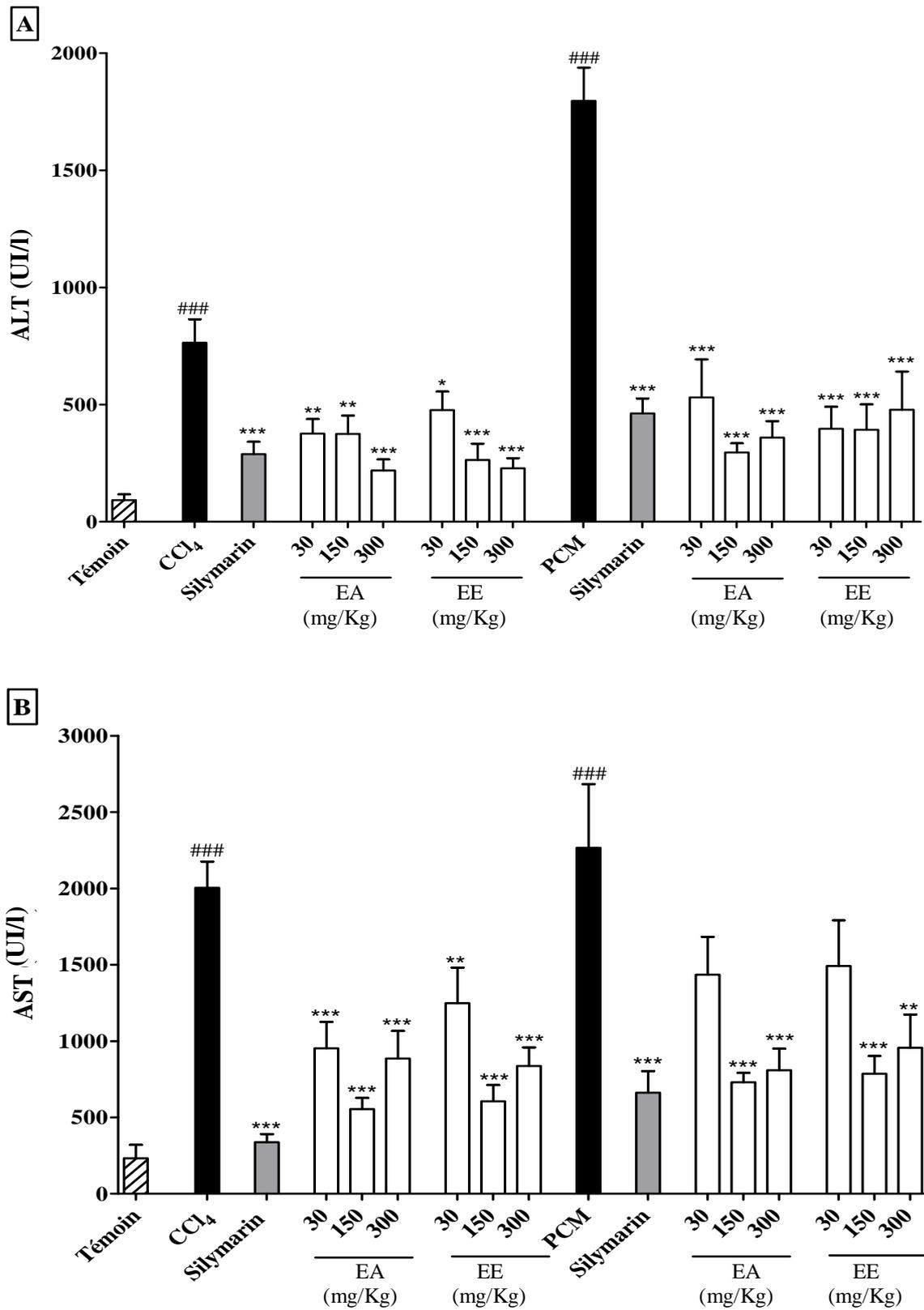
\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$  vs le groupe témoin non intoxiqué.

**Tableau 6.** Effet des extraits aqueux (EA) et éthanolique (EE) de *S. chamaecyparissus* sur l'alanine aminotransférase (ALT), l'aspartate aminotransférase (AST) et la phosphatase alcaline (PAL).

	ALT (%)	AST (%)	PAL (%)
<b>CCl<sub>4</sub></b>	/	/	/
EA 30 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	50.73 ± 8.07**	52.43 ± 8.58 ***	42.51 ± 5.20 ***
EA 150 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	50.98 ± 10.28 **	72.31 ± 3.65 ***	51.51 ± 4.20 ***
EA 300 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	71.38 ± 6.20 ***	55.83 ± 9.02 ***	45.73 ± 4.32 ***
EE 30 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	37.58 ± 10.28	37.69 ± 11.61 *	38.91 ± 6.38 ***
EE 150 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	65.49 ± 9.16 ***	69.78 ± 5.33 ***	58.52 ± 3.99 ***
EE 300 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	70.11 ± 5.65 ***	58.21 ± 6.05 ***	36.34 ± 3.66 ***
Silymarin 100 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	62.25 ± 6.96 ***	83.14 ± 2.63 ***	49.86 ± 4.33 ***
<b>PCM</b>	/	/	/
EA 30 mg/Kg + PCM	70.45 ± 9.03 ***	36.69 ± 10.96 *	21.13 ± 10.76
EA 150 mg/Kg + PCM	83.55 ± 2.18 ***	67.78 ± 2.72 ***	34.48 ± 5.91 **
EA 300 mg/Kg + PCM	79.99 ± 3.90 ***	64.30 ± 6.24 ***	24.82 ± 3.59
EE 30 mg/Kg + PCM	77.92 ± 5.25 ***	34.17 ± 13.20 *	18.01 ± 4.46
EE 150 mg/Kg + PCM	78.13 ± 5.99 ***	65.29 ± 5.10 ***	23.61 ± 4.32
EE 300 mg/Kg + PCM	73.40 ± 9.08 ***	57.81 ± 9.65 ***	27.58 ± 7.27 *
Silymarin 100 mg/Kg + PCM	74.28 ± 3.58 ***	70.77 ± 6.25 ***	26.62 ± 6.38 *

Les valeurs sont les moyennes ± SEM (n = 6).

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  vs le contrôle intoxiqué par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) ou le paracétamol (PCM).



**Figure 9.** Effet des extraits de *S. chamaecyparissus* sur les taux sériques de l'ALT (A), et l'AST (B). L'hépatotoxicité est induite par le CCl<sub>4</sub> 50% (1 ml/Kg) et le paracétamol (3 mg/Kg). Le silymarin 100 mg/Kg est utilisé comme hépatoprotecteur standard.

Les valeurs representent la moyenne ± SEM (n = 6). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  vs le contrôle (traité par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) ou le paracétamol (PCM)). # vs le groupe témoin.

#### 4.1.2. Effet sur la phosphatase alcaline

Les deux extraits réduisent le taux de PAL d'une manière similaire (**figure 10A**). La dose de 150 mg/Kg de l'EA est la meilleure dans les deux modèles d'hépatotoxicité. En effet, le prétraitement des rats par 150 mg/Kg d'extrait aqueux de la plante avant l'induction de l'hépatotoxicité par le CCl<sub>4</sub> induit une inhibition hautement significative ( $p < 0.001$ ) de la PAL avec un pourcentage d'inhibition de  $51.51 \pm 4.20\%$ . Dans le modèle du paracétamol, une diminution très significative ( $p < 0.01$ ) de la PAL est observée. Le pourcentage d'inhibition exercé par 150 mg/Kg d'EA est de  $34.48 \pm 5.91\%$  (**tableau 6**).

#### 4.1.3. Effet sur la lactate déshydrogénase

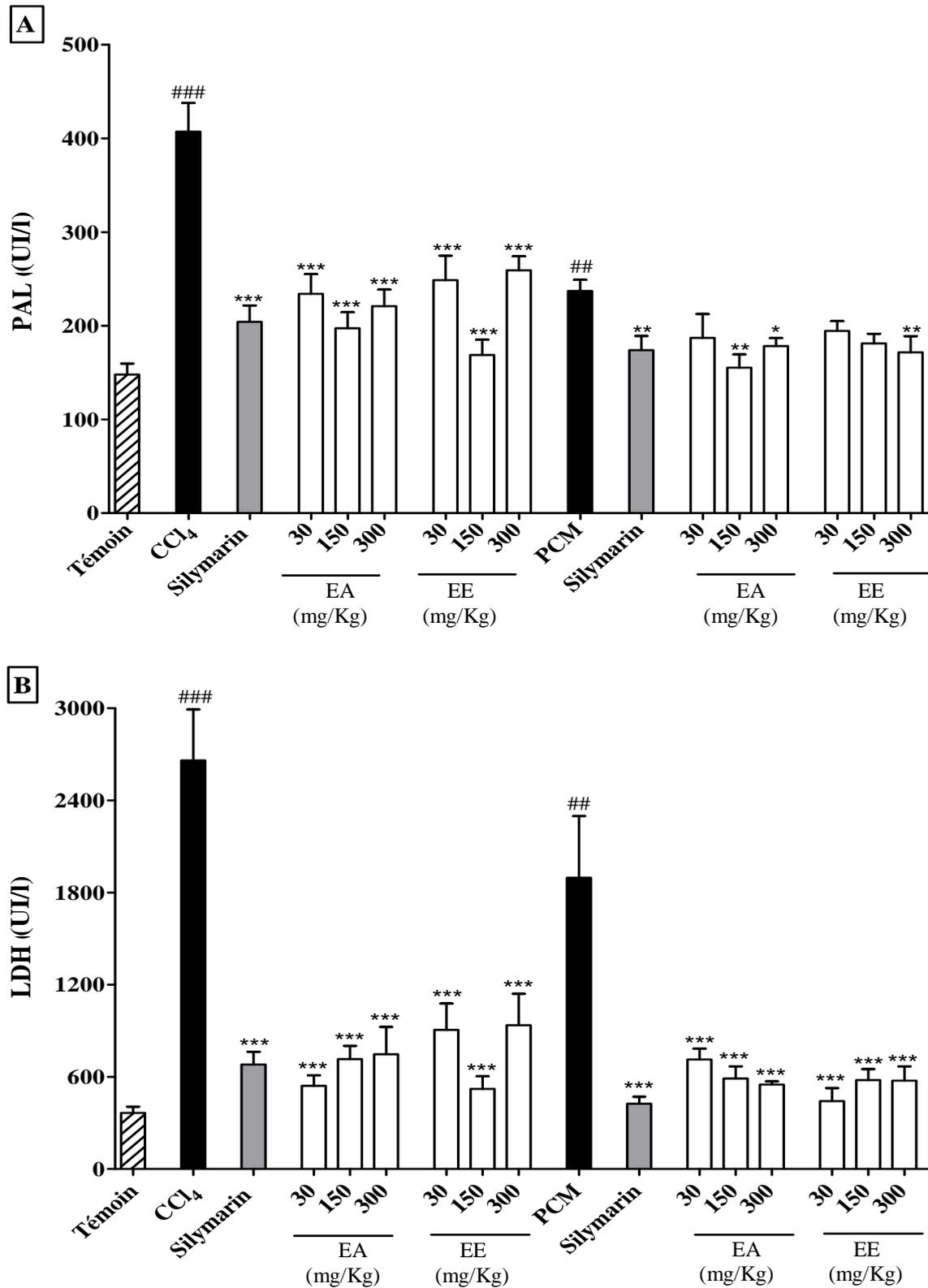
Les deux extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus* préviennent d'une manière hautement significative ( $p < 0.001$ ) l'élévation du taux de la LDH, que se soit dans le modèle de l'hépatotoxicité induite par le CCl<sub>4</sub> ou le paracétamol (**figure 10B**).

Dans le modèle du CCl<sub>4</sub>, il apparaît clairement que l'EE à la dose de 150 mg/Kg exerce un très bon effet. En effet, cette dose réduit le taux de la LDH sérique de  $2660.18 \pm 332.52$  UI/l à  $533.25 \pm 81.81$  UI/l. Cette diminution correspond à un pourcentage d'inhibition de  $80.41 \pm 3.08\%$ . Cette inhibition est beaucoup plus importante que celle exercée par le silymarin 100 mg/Kg ( $74.40 \pm 3.10\%$ ). Par contre, dans le modèle du paracétamol, l'inhibition exercée par le silymarin sur le taux de la LDH sérique est de  $77.63 \pm 2.41\%$ . Cette inhibition est plus prononcée que celle exercée par les extraits de *S. chamaecyparissus* à différentes doses.

#### 4.1.4. Effet sur la bilirubine totale

Les deux extraits étudiés exercent un effet très important sur le taux de la bilirubine totale. En effet, la bilirubine totale augmente de  $0.45 \pm 0.06$  mg/l à  $11.52 \pm 2.11$  mg/l et  $1.58 \pm 0.35$  mg/l chez les groupes intoxiqués par le CCl<sub>4</sub> et le paracétamol respectivement (**tableau 7**).

Le prétraitement des rats par 150 mg/Kg de l'EA avant l'induction de l'hépatotoxicité par le CCl<sub>4</sub> induit une diminution hautement significative ( $p < 0.001$ ) du taux de la bilirubine totale où il atteint  $0.67 \pm 0.05$  mg/Kg, ce qui correspond à  $94.21 \pm 0.43\%$ . Cet effet est proche de celui obtenu par 100 mg/Kg du silymarin ( $92.62 \pm 1.28\%$ ) (**tableau 7**). En effet, le silymarin diminue de  $52.53 \pm 5.48\%$  le taux de la bilirubine totale, tandis que l'EA à 150 mg/Kg induit une diminution de  $63.08 \pm 3.02\%$ .



**Figure 10.** Effet des extraits de *S. chamaecyparissus* sur le taux sériques de la PAL (A) et de la LDH (B). L'hépatotoxicité est induite par le CCl<sub>4</sub> 50% (1mL/Kg) et le paracétamol (3 mg/Kg). Le silymarin 100 mg/Kg est utilisé comme hépatoprotecteur standard.

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  vs le contrôle (intoxiqué par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) ou le paracétamol (PCM)). # vs le groupe témoin.

**Tableau 7.** Effet des extraits de *Santolina chamaecyparissus* sur le taux sérique de la bilirubine totale, de l'albumine et des protéines totales

	Bilirubine totale (mg/l)	Protéines totales (g/l)	Albumine (g/l)
Témoin	0.45 ± 0.06	58.38 ± 2.50	35.89 ± 3.11
CCl <sub>4</sub>	11.52 ± 2.11 ###	57.24 ± 1.02	37.75 ± 0.31
EA 30 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	1.18 ± 0.13 ***	63.48 ± 1.15	41.90 ± 0.60
EA 150 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	0.64 ± 0.05 ***	63.45 ± 1.02	40.93 ± 0,42
EA 300 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	1.02 ± 0.19 ***	61.27 ± 2.20	41.90 ± 0,86
EE 30 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	1.58 ± 0.28 ***	63.67 ± 1.60	40.23 ± 1.20
EE 150 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	0.98 ± 0.15 ***	55.98 ± 5.00	34.94 ± 2.02
EE 300 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	1.04 ± 0.16 ***	59.77 ± 2.02	39.23 ± 0.97
Silymarin 100 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	0.86 ± 0.15 ***	60.23 ± 2.37	36.96 ± 0.92
PCM	1.58 ± 0.35 ###	48.95 ± 3.24 #	35.53 ± 2.74
EA 30 mg/Kg + PCM	0.84 ± 0.09 **	59.96 ± 3.51	38.45 ± 2.15
EA 150 mg/Kg + PCM	0.58 ± 0.05 ***	51.32 ± 4.43	31.15 ± 1.71
EA 300 mg/Kg + PCM	0.68 ± 0.09 ***	55.48 ± 3.86	36.46 ± 2.73
EE 30 mg/Kg + PCM	0.65 ± 0.09 ***	56.83 ± 4.11	36.21 ± 2.82
EE 150 mg/Kg + PCM	0.70 ± 0.11 ***	59.17 ± 5.98	40.11 ± 4.10
EE 300 mg/Kg + PCM	0.82 ± 0.07 **	64.80 ± 4.38	42.60 ± 3.19
Silymarin 100 mg/Kg + PCM	0.75 ± 0.09 **	53.50 ± 3.51	41.06 ± 3.60

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n = 6).

\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. le contrôle intoxiqué par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) ou le paracétamol (PCM). # = comparaison avec le groupe témoin.

#### 4.1.5. Effet sur le taux des protéines sériques

Les résultats montrent que l'induction de l'hépatotoxicité par le CCl<sub>4</sub> n'altère ni le taux d'albumine ni le taux des protéines totaux, ainsi que le prétraitement par l'EA et l'EE (**tableau 6**). Cependant, le paracétamol diminue significativement ( $p < 0.05$ ) le taux des protéines totaux de 58.38 ± 2.50 g/l chez les rats du groupe témoin à 48.95 ± 3.24 g/l chez les rats traités.

#### 4.1.6. Effet sur le cholestérol et les triglycérides

Les résultats montrent que le CCl<sub>4</sub> et le paracétamol induisent une élévation du taux du cholestérol et des triglycérides. En effet, chez le groupe témoin, le taux du cholestérol et des triglycérides est de 46.75 ± 3.01 mg/dl et 61.00 ± 12.42 mg/dl respectivement. Tandis que, chez le groupe traité par le CCl<sub>4</sub>, le taux augmentent de manière hautement significativement ( $p < 0.001$ ) pour atteindre 82.8 ± 12.02 mg/dl et 205.20 ± 32.50 mg/dl respectivement. Par contre,

une élévation significative ( $p < 0.05$ ) est observée dans le cas de l'induction de l'hépatotoxicité par le paracétamol. Ainsi, dans ce modèle d'hépatotoxicité, le taux du cholestérol et des triglycérides est de  $65.00 \pm 2.30$  mg/dl et  $92.00 \pm 4.84$  mg/dl respectivement.

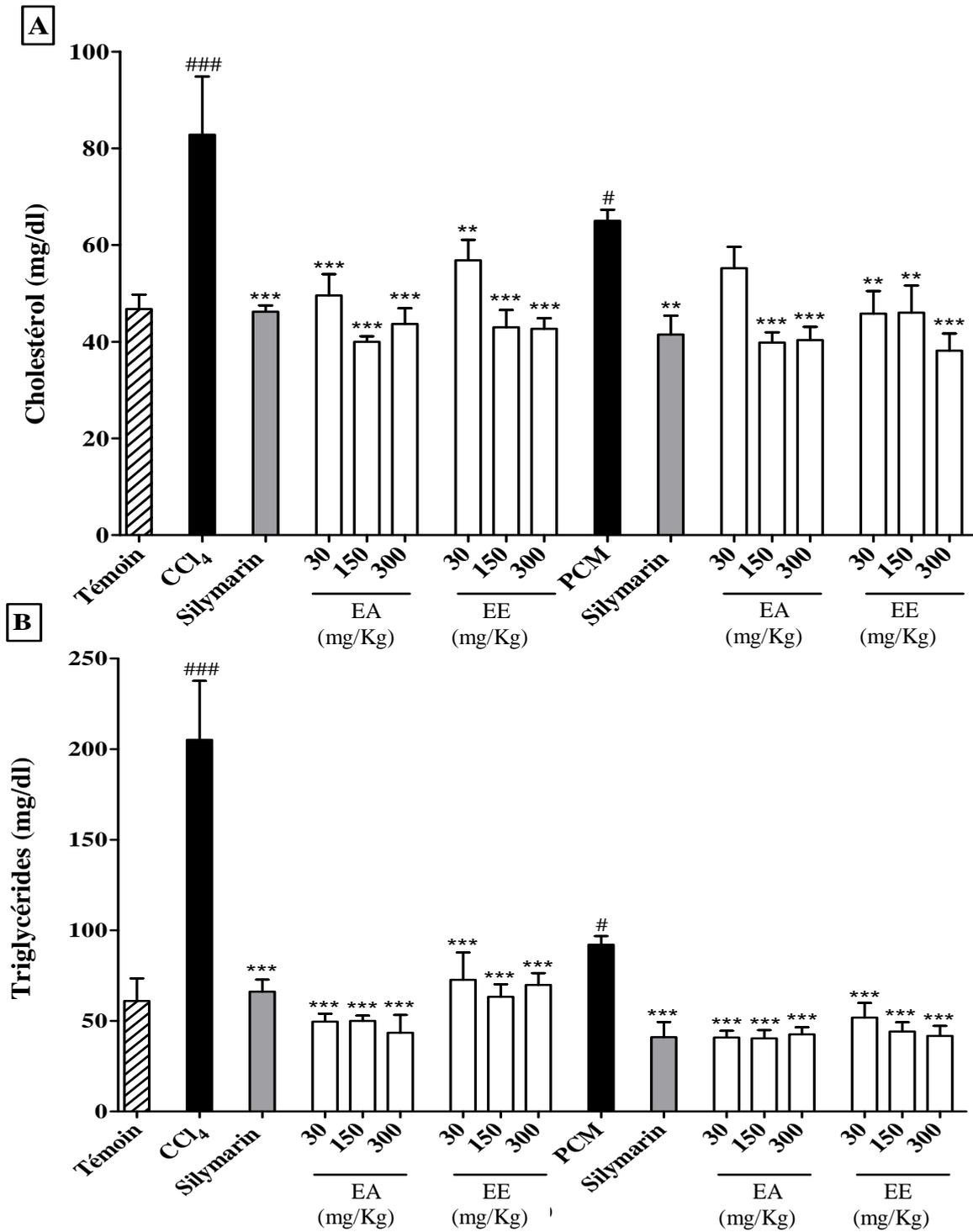
Le prétraitement des rats par les deux extraits de *S. chamaecyparissus* diminuent d'une manière hautement significativement ( $p < 0.001$ ) le taux de cholestérol et de triglycérides (**figure 11A et B**).

Dans le modèle de  $\text{CCl}_4$ , le taux du cholestérol est diminué d'une manière similaire par les deux extraits. En effet, la dose 300 mg/Kg des deux extraits aqueux et éthanolique exerce une inhibition de  $43.67 \pm 3.25\%$  et  $42.67 \pm 2.19\%$  respectivement. La dose de 150 mg/Kg est la plus efficace sur le taux des triglycérides. Cet effet est plus prononcé ( $75.63 \pm 1.43\%$ ) avec l'extrait aqueux qu'avec l'extrait éthanolique ( $69.14 \pm 3.38\%$ ). L'effet de ces deux extraits sur le cholestérol et les triglycérides est plus important que l'effet de 100 mg/Kg desilymarin ( $44.20 \pm 1.59\%$ ,  $67.76 \pm 3.24\%$  respectivement). Dans le modèle d'hépatotoxicité induite par le paracétamol, aucune différence significative n'est observée entre les deux extraits. Les pourcentages d'inhibition de taux du cholestérol et des triglycérides sont semblables pour les mêmes doses des deux extraits. Ainsi, la dose de 300 mg/Kg de l'EA et de l'EE inhibent le taux du cholestérol par  $37.95 \pm 4.22\%$ ,  $41.28 \pm 5.42\%$  et le taux de triglycérides par  $53.70 \pm 4.27\%$  et  $54.71 \pm 6.09\%$  respectivement. L'effet inhibiteur exercé par ces deux extraits est très proche de celui exercé par le silymarin (**figure 11A et B**).

#### 4.1.7. Effet sur l'urée et la créatinine

Les résultats montrent que l'hépatotoxicité induite par le  $\text{CCl}_4$  et le paracétamol chez le rat provoque une augmentation des taux des marqueurs rénaux urée et créatinine. En effet, le taux d'urée et de créatinine chez les rats du groupe témoin est de  $42.25 \pm 2.87$  mg/dl et  $0.23 \pm 0.03$  mg/dl respectivement. Une augmentation hautement significative ( $p < 0.001$ ) du taux d'urée et de créatinine est observée chez les rats traités par le  $\text{CCl}_4$ . Les taux de ces deux marqueurs rénaux atteignent  $74.20 \pm 5.62$  mg/dl et  $0.46 \pm 0.02$  mg/dl respectivement. Par contre, une élévation très significative ( $p < 0.01$ ) est observée chez les rats traités par le paracétamol. En effet, dans ce modèle d'hépatotoxicité, les taux d'urée et de créatinine sont de  $60.40 \pm 3.59$  mg/dl et  $0.38 \pm 0.03$  mg/dl respectivement.

Dans le premier modèle d'hépatotoxicité, les deux l'EA et l'EE inhibent l'élévation du taux d'urée (**figure 12A**). L'inhibition exercée par les deux extraits est statistiquement hautement significative ( $p < 0.001$ ) par rapport au groupe contrôle. Le meilleur effet est exercé par



**Figure 11.** Effet des extraits de *S. chamaecyparissus* sur le taux du cholestérol (A) et de triglycérides (B). L'hépatotoxicité est induite par le CCl<sub>4</sub> 50% (1ml/Kg) et le paracétamol (3 mg/Kg). Le silymarin 100 mg/Kg est utilisé comme hépatoprotecteur standard.

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n = 6). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  vs. le contrôle (intoxiqué par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) ou le paracétamol (PCM)). # = vs le groupe témoin.

150 mg/Kg de l'EE, avec lesquels le taux d'urée est diminué à  $42.33 \pm 2.87$  mg/dl par rapport à  $74.20 \pm 5.62$  du groupe contrôle (traité par le  $\text{CCl}_4$ ), ce qui correspond à un pourcentage d'inhibition de  $42.95 \pm 3.87\%$ . L'effet des deux extraits sur le taux d'urée est identique à celui exercé par 100 mg/Kg de silymarin ( $41.51 \pm 1.25\%$ ).

Les mêmes résultats sont observés dans le deuxième modèle d'hépatotoxicité, les trois doses des deux extraits diminuent de façon hautement significative ( $p < 0.001$ ) le taux d'urée. Cependant, les pourcentages d'inhibition exercés par ces extraits sont supérieurs à celui du silymarin ( $30.05 \pm 6.70\%$ ).

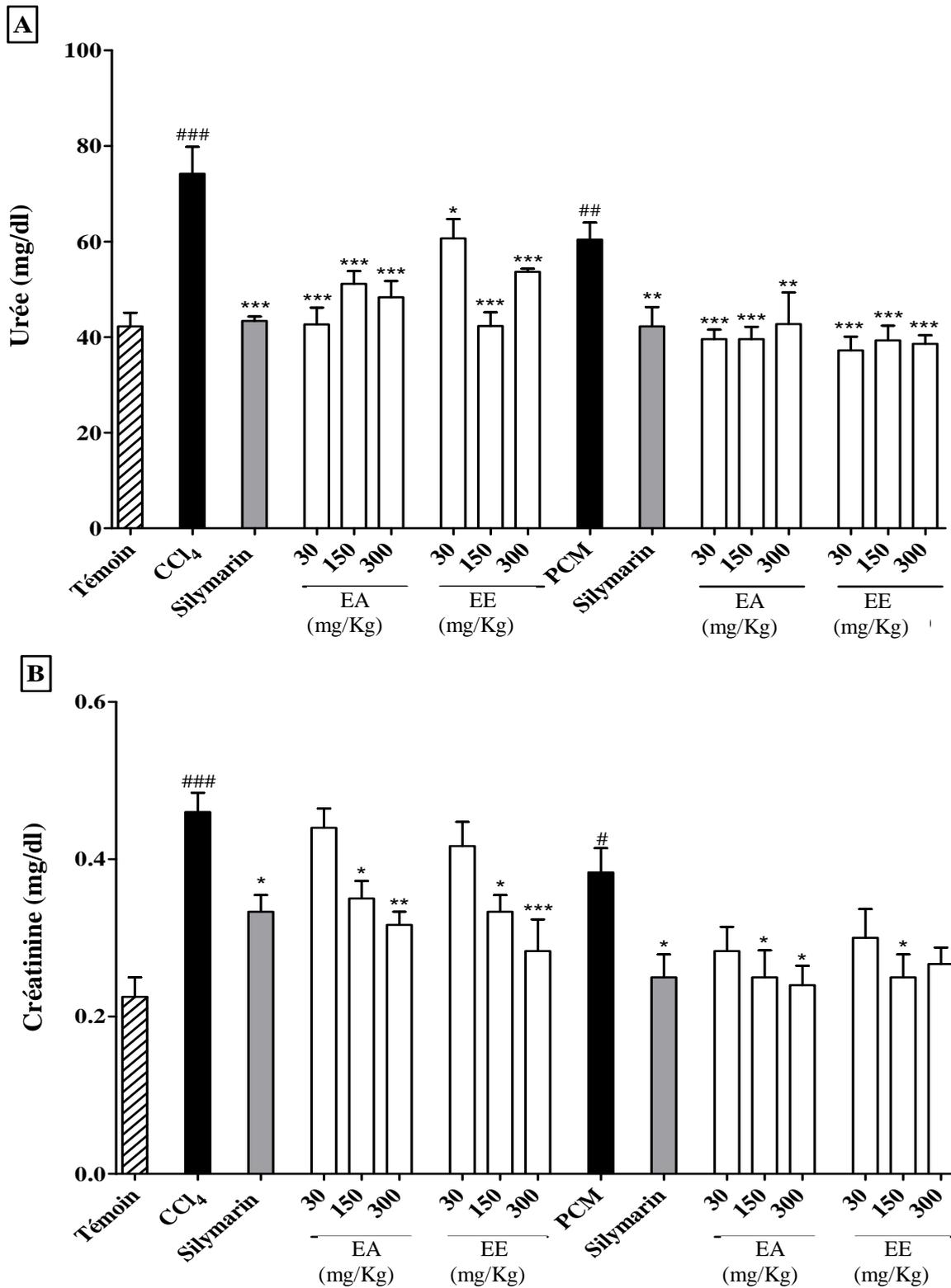
Les deux extraits empêchent de façon similaire l'augmentation du taux de la créatinine induit par le  $\text{CCl}_4$  et le paracétamol. Cette inhibition est dose dépendante uniquement dans le cas du  $\text{CCl}_4$  (**figure 12B**). Une inhibition de  $31.16 \pm 3.62\%$  et de  $38.41 \pm 8.73\%$  est observée dans les groupes traités par 300 mg/Kg d'EA et d'EE respectivement. L'effet de ces 2 extraits sur la créatinine semble être plus efficace que l'effet de 100 mg/Kg de silymarin ( $27.54 \pm 4.58\%$ ). Les mêmes résultats sont obtenus dans le deuxième modèle d'hépatotoxicité induite par le paracétamol. La dose de 300 mg/Kg de EA paraît être la meilleure dose avec un pourcentage d'inhibition de  $37.39 \pm 6.39\%$ .

## 4.2. Effet sur les paramètres antioxydants

L'effet de l'EA et de l'EE sur le malondialdéhyde, la catalase et la superoxyde dismutase est évalué au niveau du surnageant du foie des rats traités.

### 4.2.1. Effet s sur le MDA

Les résultats montrent que l'injection intrapéritonéale du  $\text{CCl}_4$  ou l'administration orale du paracétamol induisent une élévation hautement significative ( $p < 0.001$ ) de la concentration du malondialdéhyde. Le taux du MDA au niveau du surnageant du foie des rats intoxiqués est de  $15.88 \pm 1.88$  et  $13.71 \pm 2.45$   $\mu\text{mol/mg}$  de protéines respectivement. Le prétraitement avec les extraits de *S. chamaecyparissus* (30, 150 et 300 mg/Kg) réduit H significativement ( $p < 0.001$ ) le taux du MDA en comparaison avec les groupes contrôles (**tableau 8**). A 150 mg/Kg l'EA exerce l'effet le plus prononcé dans les deux modèles d'hépatotoxicité, les pourcentages d'inhibition sont de  $53.57 \pm 5.03\%$  et  $48.47 \pm 2.22\%$  respectivement. Dans le modèle d'hépatotoxicité induite par le  $\text{CCl}_4$ , cet effet est très proche de celui obtenu par le prétraitement avec 100 mg/Kg de silymarin ( $59.51 \pm 2.30\%$ ), mais plus prononcé que celui obtenu par le silymarin ( $38.08 \pm 3.83\%$ ) dans le cas d'hépatotoxicité induite par le paracétamol.



**Figure 12.** Effet des extraits de *S. chamaecyparissus* sur le taux d'urée (A) et de créatinine (B). L'hépatotoxicité est induite par le CCl<sub>4</sub> 50% (1ml/Kg) et le paracétamol (3 mg/Kg). Le silymarin 100 mg/Kg est utilisé comme hépatoprotecteur standard.

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  vs. le contrôle (traitement par le CCl<sub>4</sub> ou le paracétamol (PCM)).# = vs le groupe témoin.

#### 4.2.2. Effet sur la catalase

Les résultats présentés dans le **tableau 8** montrent que l'intoxication avec le  $\text{CCl}_4$  n'induit aucun changement significatif dans l'activité de la catalase. De même, le prétraitement par le silymarin, l'EA et l'EE ne montrent aucune modification de la catalase. Par contre, dans le deuxième modèle d'hépatotoxicité, l'administration du paracétamol induit une diminution hautement significative ( $p < 0.001$ ) de la catalase. En effet, chez les rats du groupe témoin non intoxiqués l'activité de l'enzyme est de  $540.99 \pm 44.20 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  de protéines.

Cette activité enzymatique est réduite chez les rats du groupe contrôle traités par le paracétamol et atteint une valeur de  $280.44 \pm 24.24 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  de protéines. Le prétraitement par 300 mg/Kg d'extrait aqueux restaure l'activité enzymatique de la catalase ( $414.45 \pm 43.70 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  de protéines).

#### 4.2.3. Effet sur SOD

L'activité de la SOD diminue de  $78.12 \pm 4.99$  et de  $62.72 \pm 4.26\%$  sous l'effet du  $\text{CCl}_4$  et du paracétamol respectivement. En revanche, le prétraitement par le silymarin et les extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus* restaure l'activité enzymatique de cette protéine (**Tableau 7**).

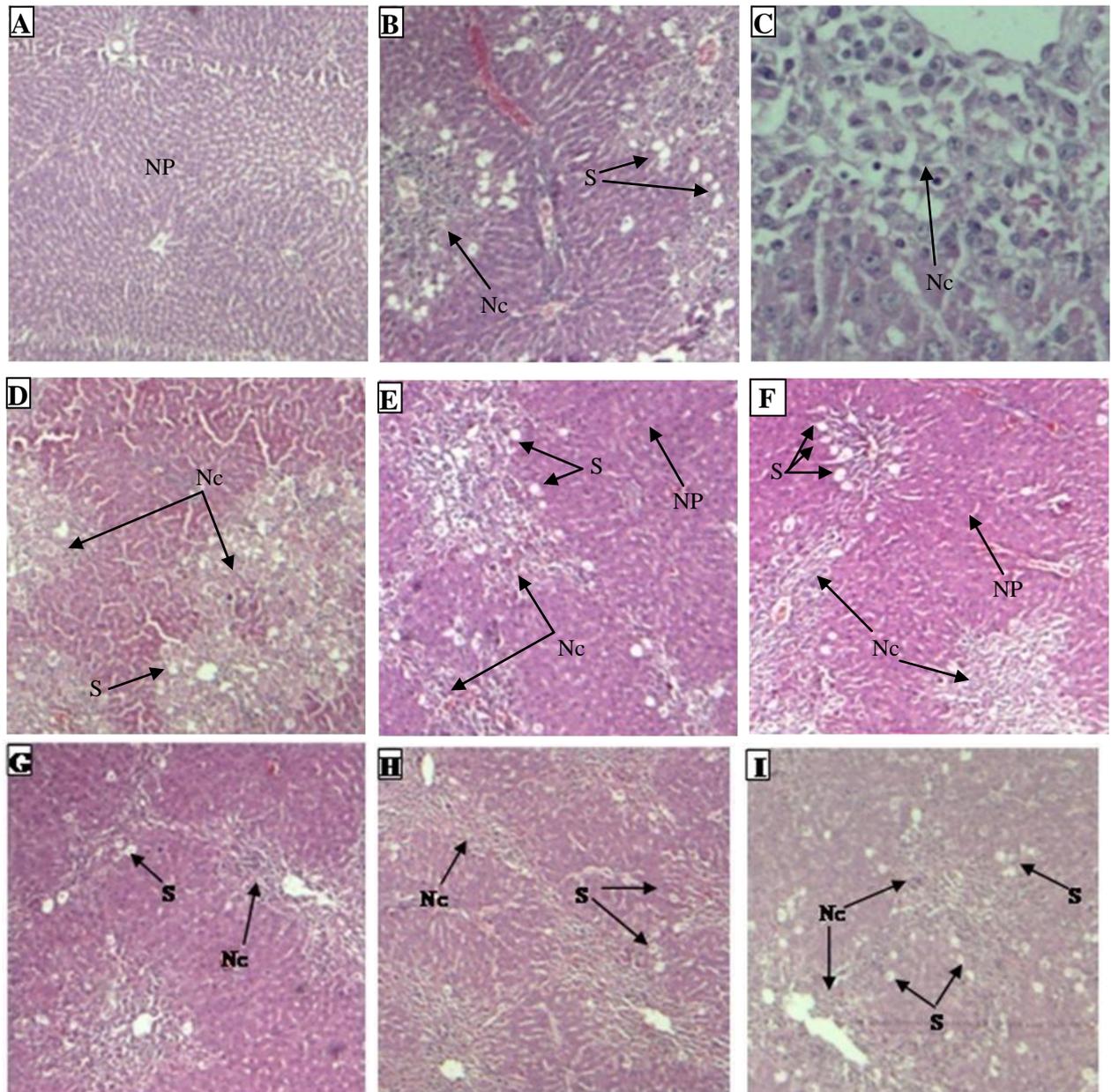
### 4.3. Effet des extraits de *S. chamaecyparissus* sur l'histologie du foie

L'examen histologique du tissu hépatique des rats traités par le  $\text{CCl}_4$  et le paracétamol montre d'importantes différences avec le tissu hépatique des rats témoins non intoxiqués (**figure 13A**). En effet, l'administration intra-péritonéale du  $\text{CCl}_4$  chez les rats induit une stéatose fortement prononcée et une nécrose périvasculaire (**figure 13B**). Tandis que le paracétamol induit beaucoup plus une nécrose hépatique (**figure 14B**). Cependant, l'examen histologique du tissu hépatique des groupes prétraités avec les deux extraits montre une réduction de la nécrose et de la stéatose. En effet, les trois doses étudiées de l'EA et l'EE (30, 150 et 300 mg/Kg) diminuent la surface des zones nécrotiques périvasculaires. La stéatose est réduite chez les rats prétraités par ces extraits, un dépôt minimal de vacuoles de graisse est observé. D'une manière similaire, les changements histologiques sont également réduits dans le foie des rats prétraités avec 100 mg/Kg de silymarin (**figure 13** et **14C-I**).

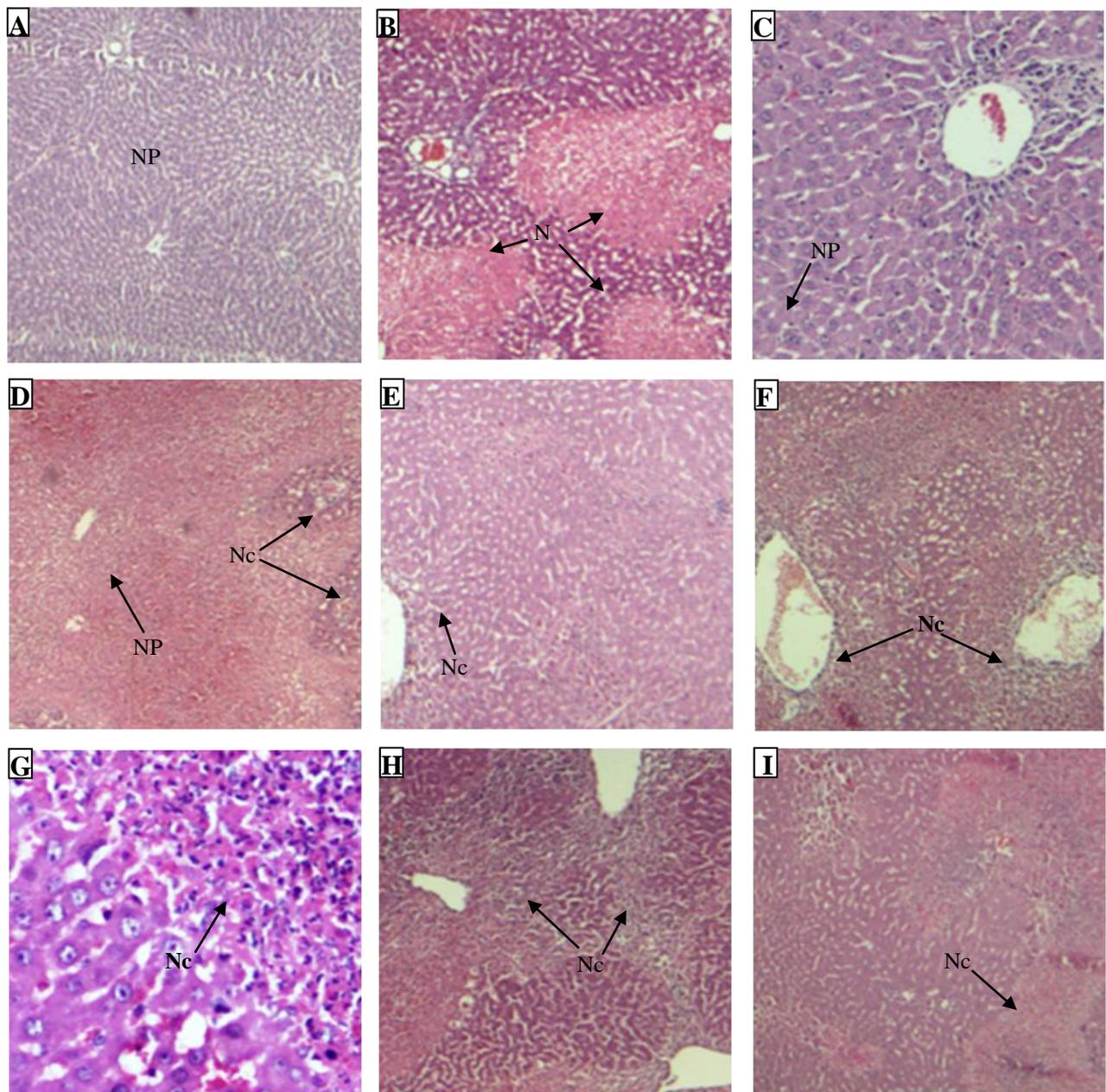
**Tableau 8.** Effet de l'extrait aqueux (EA) et éthanolique (EE) de *S. chamaecyparissus* sur le MDA, la catalase et la SOD du surnageant hépatique.

	MDA μmoles/mg protéines	Catalase U/mg protéines	SOD U/mg protéines
Témoin	4.16 ± 0.35	540.99 ± 44.20	193.55 ± 22.22
CCl <sub>4</sub>	15.88 ± 1.88 ###	496.32 ± 47.01	42.34 ± 9.65 ###
Silymarin + CCl <sub>4</sub>	6.43 ± 0.37 ***	599.67 ± 61.14	157.50 ± 14.93 ***
EA 30 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	8.53 ± 1.30 ***	552.50 ± 16.59	125.83 ± 11.71 **
EA 150 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	7.37 ± 0.80 ***	593.17 ± 38.10	139.01 ± 13.86 ***
EA 300 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	9.25 ± 1.46 **	628.56 ± 36.15	107.18 ± 21.06 *
EE 30 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	9.37 ± 1.21 **	509.90 ± 39.77	74.60 ± 7.62
EE 150 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	8.63 ± 0.96 **	541.53 ± 24.49	127.37 ± 11.22 **
EE 300 mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	7.16 ± 0.91 ***	606.67 ± 29.15	123.54 ± 17.60 **
PCM	13.71 ± 2.45 ###	280.44 ± 24.24 ###	72.15 ± 8.24 ###
Silymarin + PCM	8.49 ± 0.53 *	349.71 ± 30.45	201.83 ± 15.55 ***
EA 30 mg/Kg + PCM	11.13 ± 1.43	299.38 ± 17.83	209.88 ± 18.68 ***
EA 150 mg/Kg + PCM	7.06 ± 0.30 ***	339.98 ± 17.20	193.61 ± 12.25 ***
EA 300 mg/Kg + PCM	8.07 ± 0.86 **	414.45 ± 43.70 *	183.61 ± 7.34 ***
EE 30 mg/Kg + PCM	9.10 ± 0.90 *	308.65 ± 37.09	131.16 ± 13.15 *
EE 150 mg/Kg + PCM	7.59 ± 0.40 **	264.71 ± 24.92	150.84 ± 13.70 ***
EE 300 mg/Kg + PCM	8.01 ± 0.60 **	263.20 ± 12.08	176.50 ± 12.27 ***

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n = 6). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  vs le contrôle (traitement par le CCl<sub>4</sub> ou le paracétamol (PCM) # = comparaison avec le groupe témoin.



**Figure 13.** Coupes histologiques du foie (x 100) de rats traités avec le  $\text{CCl}_4$ . **A**: parenchyme hépatique des rats normaux, **B**: parenchyme hépatique des rats traités par le  $\text{CCl}_4$ , **C**: parenchyme hépatique des rats prétraités par 100 mg/Kg de silymarin, **D**: parenchyme hépatique des rats prétraités par 30 mg/Kg d'EA, **E**: parenchyme hépatique des rats prétraités par 150 mg/Kg d'EA, **F**: parenchyme hépatique des rats prétraités par 300 mg/Kg d'EA, **G**: parenchyme hépatique des rats prétraités par 30 mg/Kg d'EE, **H**: parenchyme hépatique des rats prétraités par 150 mg/Kg d'EE, **I**: parenchyme hépatique des rats prétraités par 300 mg/Kg d'EE. (Nc, nécrose ; S, stéatose ; NP, parenchyme normal).



**Figure 14.** Coupes histologiques du foie (x 100) de rats traités par le paracétamol. **A:** parenchyme hépatique des rats normaux, **B:** parenchyme hépatique des rats intoxiqués par le paracétamol, **C:** parenchyme hépatique des rats prétraités par 100 mg/Kg de silymarin, **D:** parenchyme hépatique des rats prétraités par 30 mg/Kg d'EA, **E:** parenchyme hépatique des rats prétraités par 150 mg/Kg d'EA, **F:** parenchyme hépatique des rats prétraités par 300 mg/Kg d'EA, **G:** parenchyme hépatique des rats prétraités par 30 mg/Kg d'EE, **H:** parenchyme hépatique des rats prétraités par 150 mg/Kg d'EE, **I:** parenchyme hépatique des rats prétraités par 300 mg/Kg d'EE. (Nc, nécrose ; NP, parenchyme normal).

## 5. Activités anti-oxydantes des extraits de *S. chamaecyparissus*

### 5.1. Effet anti-radicalaire

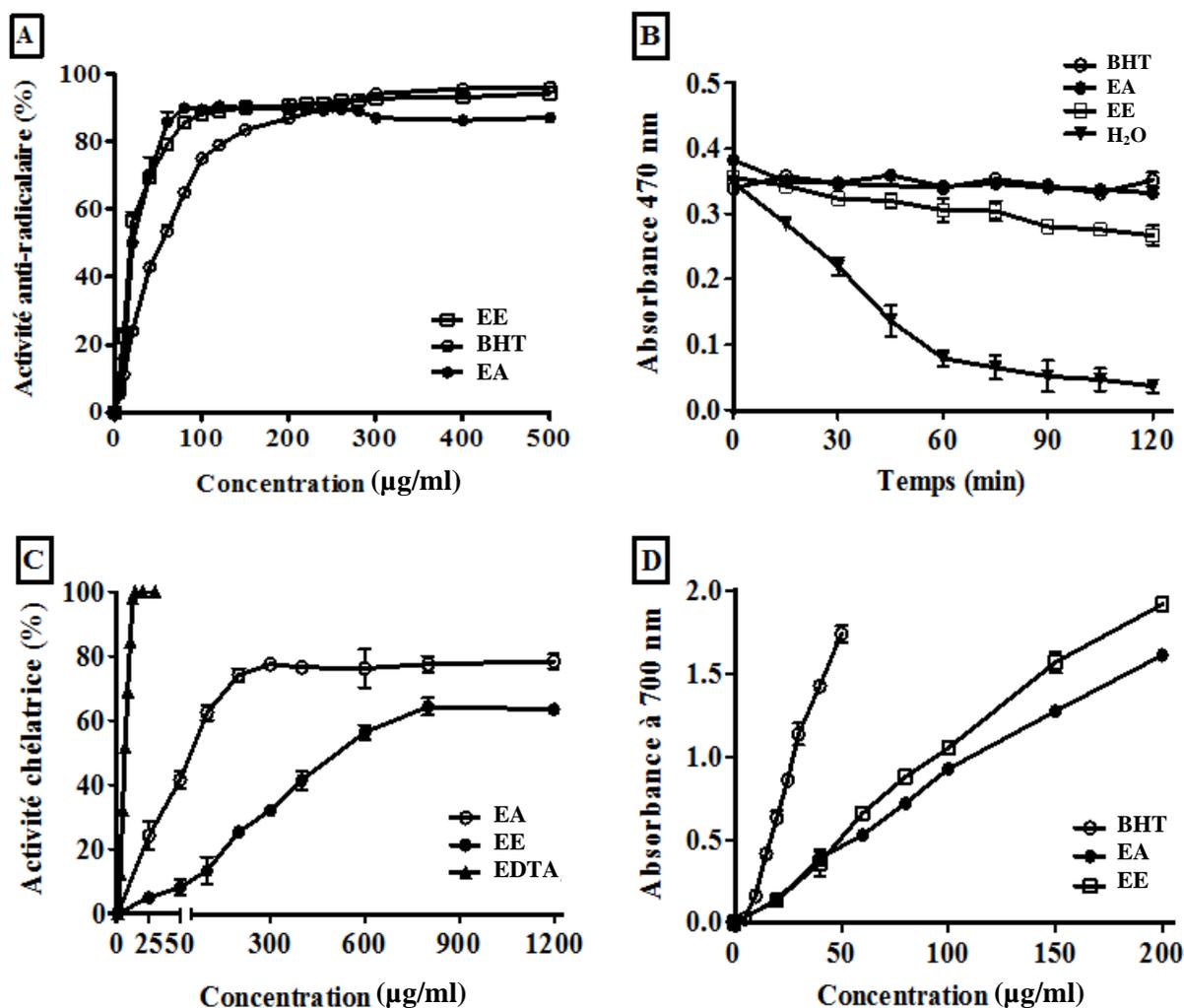
L'activité antioxydante des extraits de *S. Chamaecyparissus vis-à-vis* du radical DPPH est évaluée en suivant la réduction de ce radical. Les résultats montrent que les extraits aqueux et éthanolique ont une activité anti-radicalaire (**figure 15A**). En effet, à la concentration de 80 µg/ml, l'EE et l'EA exercent une activité significative de piégeage des radicaux libres avec des taux de 85.71% et 89.95%, respectivement. La meilleure activité est exercée par l'EA avec une IC<sub>50</sub> de 35.27 ± 3.24 µg/ml puis l'EE avec une IC<sub>50</sub> de 41.06 ± 0.94 µg/ml. Ces valeurs sont meilleures que celle obtenue avec le BHT (IC<sub>50</sub> = 61.69 ± 5.02 µg/ml), utilisé comme anti-oxydant de référence.

### 5.2. Effet sur l'oxydation de la β-carotène

La cinétique de blanchissement de la β-carotène (**figure 15B**), montre que les deux extraits de *S. chamaecyparissus* inhibent l'oxydation de la β-carotène d'une manière significative ( $p < 0.05$ ). Au temps zéro, l'absorbance de la β-carotène est de 0.359 ± 0.018, mais après 120 min elle atteint une valeur minimale de 0.045 ± 0.018 en absence d'anti-oxydant, ce qui indique une peroxydation totale de la β-carotène. Cependant, les absorbances de la β-carotène en présence de l'EA et de l'EE ne diminuent que légèrement pour atteindre des valeurs de 0.331 ± 0.002 et 0.267 ± 0.015 respectivement à la 120<sup>ème</sup> min, indiquant ainsi une forte activité antioxydante. Par contre, les absorbances de la β-carotène en présence du BHT restent stables tout au long des 120 minutes. Le BHT présente une activité anti-oxydante très puissante (100%) par rapport à celle montré par l'extrait aqueux et éthanolique de la plante (83.62% ± 8.85, 71.52% ± 3.28; respectivement).

### 5.3. Effet chélateur du fer ferreux

Les deux extraits de *S. chamaecyparissus* montrent une activité chélatrice concentration dépendante. Cependant, une grande différence est observée entre l'effet de l'extraits aqueux et éthanolique. En effet, à 200 µg/ml, l'EA induit une chélation de 74.11%, tandis que l'EE induit une chélation de 25.36% (**figure 15C**). L'EDTA, utilisé comme chélateur de référence, présente un bon effet chélateur avec une concentration inhibitrice (IC<sub>50</sub>) égale à 5.97 µg/ml suivie par l'EA (IC<sub>50</sub> = 73.51 ± 2.94 µg/ml) et l'EE (507.43 ± 12.44 µg/ml).



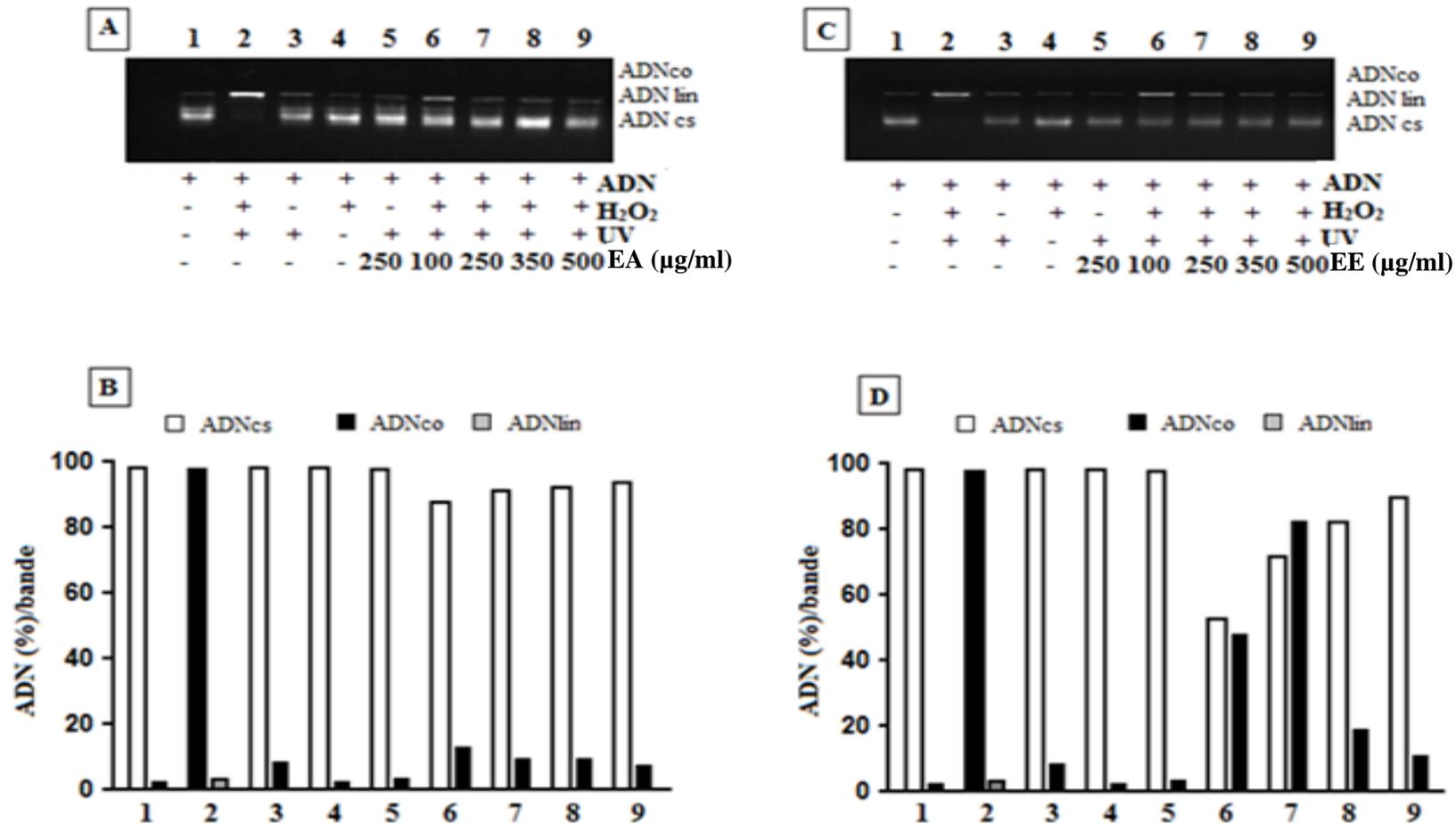
**Figure 15.** Activités anti-oxydantes des extraits de *S. chamaecyparissus*. (A) activité anti radicalaire DPPH (B) blanchissement de la  $\beta$ -carotène (C) chélation des ions de Fer (D) pouvoir réducteur. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

#### 5.4. Pouvoir réducteur

Les résultats obtenus (**figure 15D**) montrent que les deux extraits de *S. chamaecyparissus* exercent un pouvoir réducteur, concentration dépendante. L'extrait éthanolique est doué d'un pouvoir réducteur plus prononcé ( $IC_{50} = 49.12 \mu\text{g/ml}$ ) que celui de l'extrait aqueux ( $IC_{50} = 57.03 \mu\text{g/ml}$ ). Cependant, le BHT utilisé comme anti-oxydant standard présente un pouvoir réducteur puissant avec une valeur d' $IC_{50}$  de  $16.10 \mu\text{g/ml}$  seulement.

#### 5.5. Effet sur l'oxydation de l'ADN

Les profils électrophorétiques de l'ADN suite à la lyse induite par le modèle UV/  $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence des différentes concentrations (100, 250, 350 et 500  $\mu\text{g/ml}$ ) d'EA et d'EE sont représentés sur la **figure 16**. La conversion de l'ADN circulaire surenroulé (ADNcs) en forme circulaire ouverte (ADNco) provenant de l'ADN plasmidique pBluescript M13+ se traduit par l'apparition de deux bandes sur le gel d'électrophorèse (raie 1). La forme native de l'ADNcs migre plus rapidement que l'ADNco. Les résultats montrent d'une part que l'irradiation UV de l'ADN en présence du peroxyde d'hydrogène (raie 2) entraîne le clivage de l'ADN et sa conversion en forme circulaire (ADNc) et forme linéaire (ADNlin). D'autre part, les rayonnements UV seuls (raie 3), le  $\text{H}_2\text{O}_2$  seul (raie 4) et les UV en combinaison avec la concentration 250  $\mu\text{g/ml}$  des extraits (raie 5) n'altèrent pas la structure de l'ADN. L'addition des extraits de *S. chamaecyparissus* (raies 6-9) au milieu réactionnel induit une restauration partielle de l'ADNcs. Les différentes concentrations des deux extraits exercent une protection significative. En effet, l'intensité des bandes de l'ADNcs scannée à partir du gel d'agarose montre que l'EA exerce un effet plus puissant par rapport à l'EESC (**figure 16B et D**). Les différentes concentrations de l'EA protègent l'ADN contre la scission de ses brins induite par les UV et le peroxyde d'hydrogène de la même manière. Par contre l'EE, exerce une protection concentration dépendante. Le pourcentage de l'ADNcs dans le cas de traitement avec l'EA 100  $\mu\text{g/ml}$  est plus élevé (87.57%) que celui de l'EE (52.57%) à la même concentration.



**Figure 16.** Activité protectrice des extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus* contre la dénaturation de l'ADN. **A** et **B** représentent les profils électrophorétiques de l'ADN plasmidique pBluescript M13+ après photolyse induite par UV et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mM). **C** et **D** représentent le pourcentage de l'ADN circulaire surenroulé, l'ADN circulaire ouvert et l'ADN linéaire quantifié par le logiciel (Discovery Series Quantity One programme; version 4.5.2, BioRad, Ca, USA).

## 5.6. Effet sur l'oxydation des protéines

Les **figures 17A** et **17C** montre les profils électrophorétiques de la BSA après 3h d'incubation avec le système dénaturant ( $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{acide ascorbique}$ ) en présence ou en absence des différentes concentrations de l'EA et de l'EE. La densité de ces bandes électrophorétiques est présentée sur la **figure 17B** et **D**. La densité de la bande de BSA dénaturée (raie 2) diminue de  $45.9 \pm 3.61\%$ . Le traitement avec les différentes concentrations (50 à 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) des deux extraits (raies 3-7) protège la BSA de la dénaturation. Cette protection est concentration dépendante dans le cas de l'EE. En effet, les concentrations 50, 100, 250, 500 et 1000  $\mu\text{g/ml}$  de cet extrait restaurent l'intensité des bandes de BSA par 60.83%, 62.35%, 70.71%, 76.75% et 86.67%, respectivement. Tandis que les différentes concentrations de l'EA restaurent l'intensité des bandes de BSA par  $91.92 \pm 4.40\%$ , à l'exception de la concentration de 50  $\mu\text{g/ml}$  qui donne un taux de 58.93% seulement

## 6. Activités anti inflammatoires des extraits de *S. chamaecyparissus*

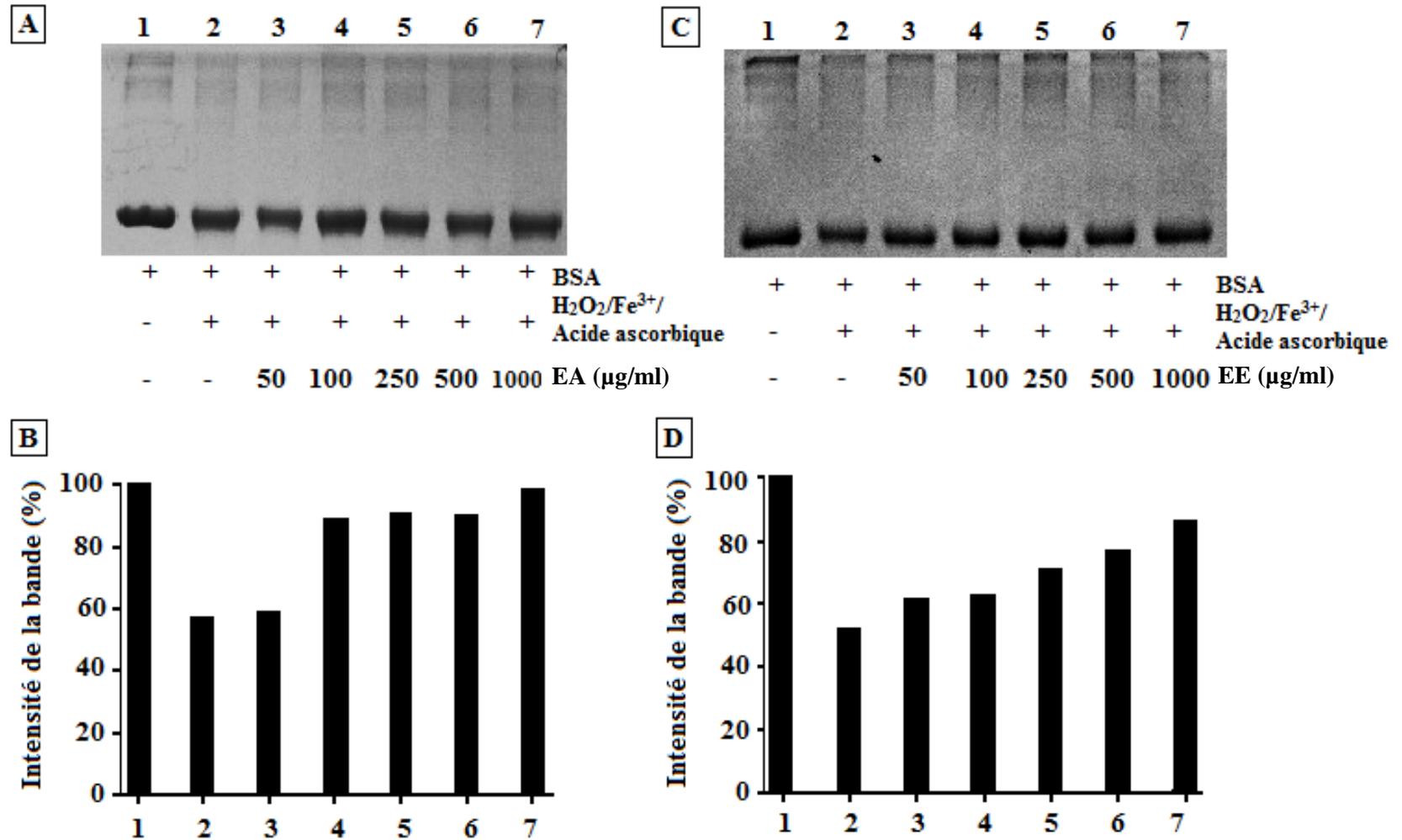
### 6.1. Activités anti inflammatoires *in vivo*

#### 6.1.1. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton

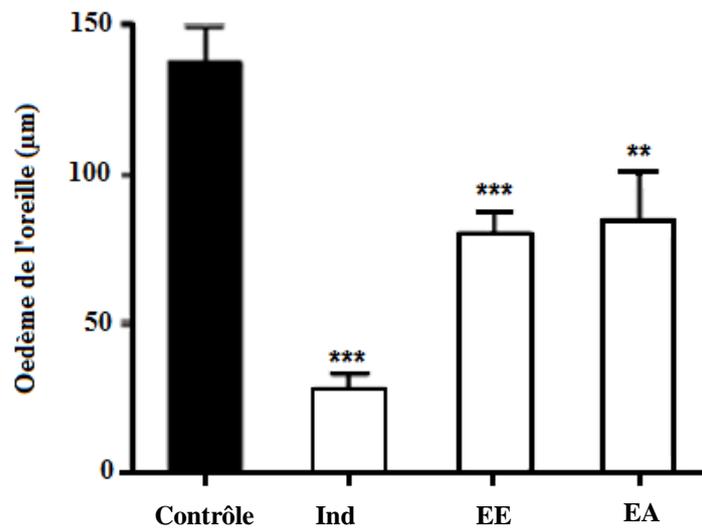
L'application topique de l'huile de croton sur l'oreille induit le développement d'un œdème d'une épaisseur de  $137 \pm 13 \mu\text{m}$  chez les souris du groupe contrôle. Le traitement par 2 mg d'EA et d'EE réduit significativement ( $p < 0.01$ ) l'œdème. L'effet exercé par l'extrait éthanolique est beaucoup plus élevé ( $80 \pm 8.16 \mu\text{m}$  soit 41%) que celui exercé par l'extrait aqueux ( $94.44 \pm 14.54 \mu\text{m}$  soit 31%). Les souris traitées par 0.5 mg/oreille d'indométacine (anti-inflammatoire de référence) donnent des épaisseurs de l'œdème de seulement  $25.56 \pm 5.80 \mu\text{m}$ , Ce qui correspond à un pourcentage d'inhibition de 81.35% (**figure 18**).

#### 6.1.2. Effet sur le recrutement des neutrophiles vers la poche d'air

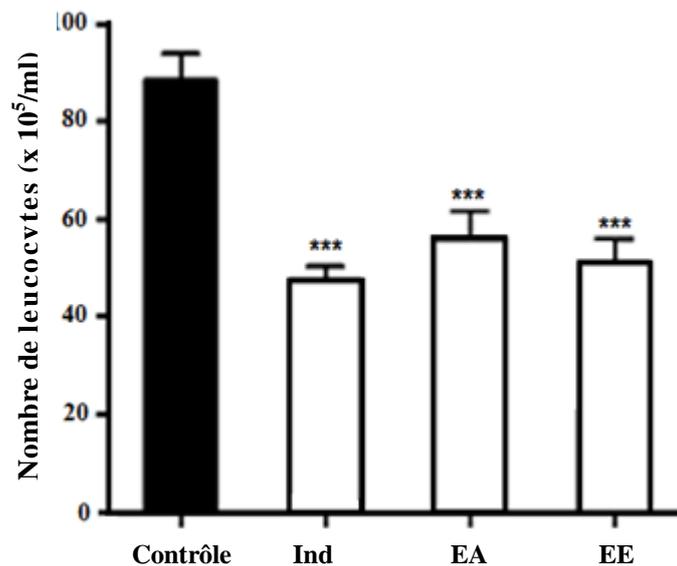
Les résultats montrent qu'après 4h de l'injection de 0.1 ml de  $\lambda$ -carrageenan dans la poche d'air, les souris du groupe témoin développent une inflammation aiguë caractérisée par une infiltration de  $8.84 \pm 0.54 \times 10^6$  leucocytes/ml dans l'exsudat de la poche d'air. Le traitement avec 1 mg/poche d'EE ou d'EA réduit significativement ( $p < 0.001$ ) le nombre de leucocytes infiltrés à  $5.12 \pm 0.48 \times 10^6$  leucocytes/ml et  $5.60 \pm 0.56 \times 10^6$  leucocytes/ml d'exsudat, respectivement. Ces valeurs correspondent respectivement à 42.08% et 36.67% d'inhibition par rapport au groupe contrôle. L'inhibition exercée par l'EE est proche de celle obtenue avec 0.1 mg/poche d'indométacine (46.45%) (**figure 19**).



**Figure 17.** Activité protectrice des extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus* contre l'oxydation de la BSA. **A** et **B** représentent les profils électrophorétiques de la BSA suite à l'oxydation induite par le système dénaturant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup>/acide ascorbique. **C** et **D** représentent le pourcentage de la BSA quantifiée par le logiciel (discovery series Quantity One programme; version 4.5.2, BioRad, Ca, USA).



**Figure 18.** Effet des extraits de *S. chamaecyparissus* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. L'œdème est induit par application locale de 80 µg d'huile de croton sur la face interne de l'oreille droite. Les souris sont traitées localement par l'indométacine 0.5 mg/oreille (Ind), 2 mg/oreille des extraits éthanolique (EE) ou aqueux (EA). Les souris du groupe contrôle reçoivent uniquement l'agent irritant. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n = 6). \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$  vs. le contrôle non traité.



**Figure 19.** Effet de l'extrait aqueux (EA) et de l'extrait éthanolique (EE) de *S. chamaecyparissus* sur l'infiltration des leucocytes vers la poche d'air. L'inflammation est induite par l'injection de 0.1 ml de λ-carrageenan (1%) dans la poche d'air. Une heure avant l'induction de l'inflammation, les souris sont traitées par 1 mg/poche d'extraits ou 0.1 mg/poche d'indométacine (Ind). Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n = 6). \*\*\* :  $p < 0.001$  vs. le contrôle.

## 6.2. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

### 6.2.1. Effet sur la libération des cytokines

#### A/ Effet sur le TNF- $\alpha$

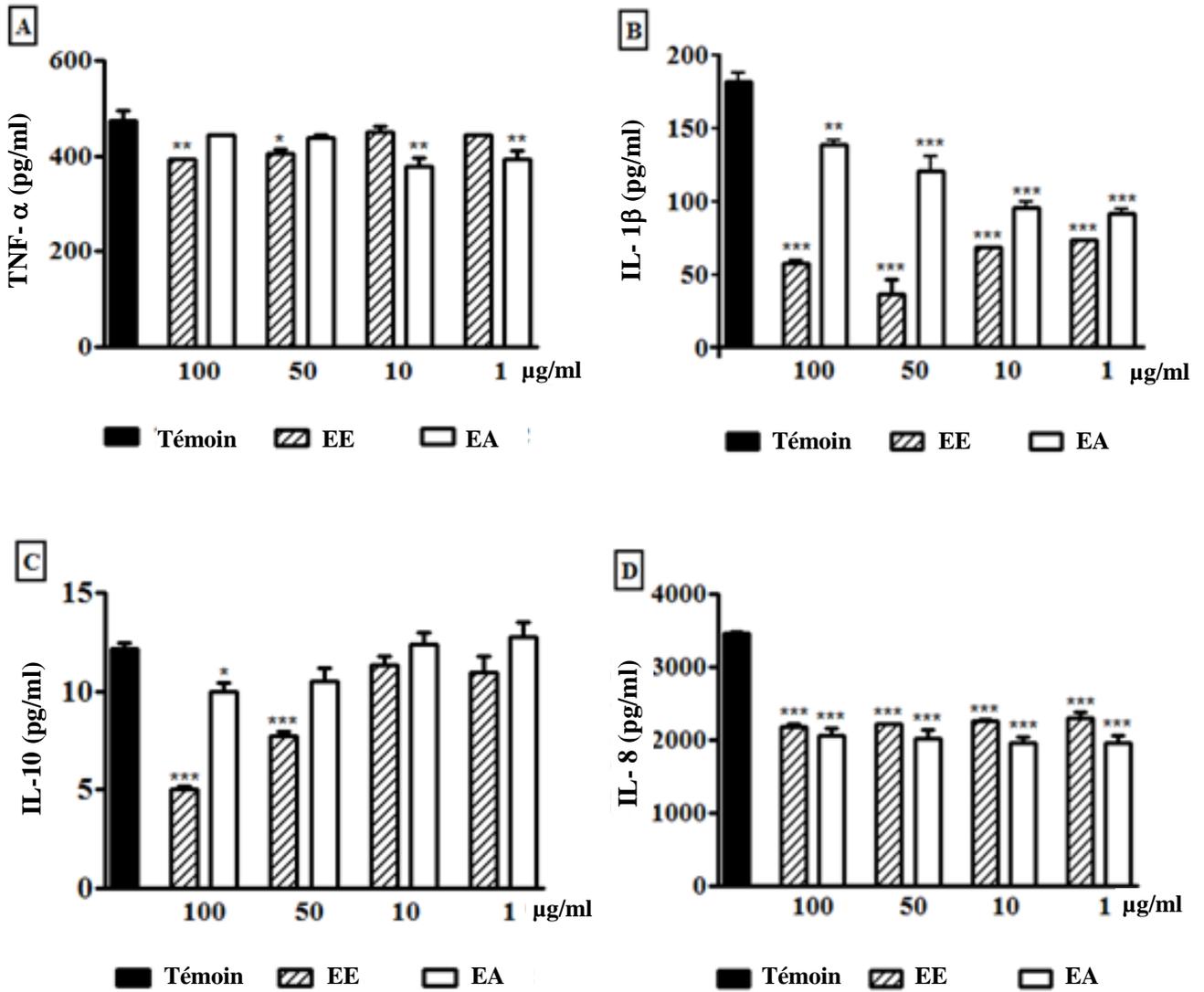
La stimulation des cellules mononucléaires périphériques par la concanavaline A se traduit par une sécrétion massive du TNF- $\alpha$  ( $474.01 \pm 31.84$  pg/ml) par rapport aux cellules non stimulées. La sécrétion du TNF- $\alpha$  par ces cellules est significativement ( $p < 0.01$ ) diminuée sous l'effet des faibles concentrations (10 et 1  $\mu$ g/ml) de l'EA et des fortes concentrations (100 et 50  $\mu$ g/ml) de l'EE (**figure 20A**). La meilleure inhibition ( $20.02 \pm 4.77\%$ ) est obtenue avec 10  $\mu$ g/ml de l'EA.

#### B/ Effet sur l'IL-1 $\beta$

Comme le montre la **figure 20B**, la concanavaline A stimule fortement la production de l'IL-1 $\beta$  par les mononucléaires périphériques. Cette production de  $182.10 \pm 9.11$  pg/ml, est nettement supérieure à celle des cellules non stimulées ( $p < 0.001$ ). En effet, les cellules non stimulées par ce mitogène ne produisent qu'une faible quantité de cet interleukine ( $1.61 \pm 0.15$  pg/ml). La sécrétion de l'IL-1 $\beta$  par les mononucléaires stimulés est significativement ( $p < 0.001$ ) diminuée sous l'effet des deux extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus*. L'effet de l'EE est plus fort que celui de l'EA. La meilleure inhibition ( $79.63 \pm 7.82\%$ ) est obtenue avec 50  $\mu$ g/ml de l'EE.

#### C/ Effet sur l'IL-10

Comme le montre les résultats de la **figure 20C**, la concanavaline A stimule également la sécrétion de l'IL-10 par les cellules mononucléaires périphériques. Cependant, le taux de l'IL-10 sécrété est modéré ( $12.20 \pm 0.50$  pg/ml). L'EE à 100 et 50  $\mu$ g/ml réduit de manière hautement significative ( $p < 0.001$ ) le taux d'IL-10 produit par les cellules mononucléaires périphériques avec un pourcentage d'inhibition de  $59.01 \pm 2.59\%$  et  $36.17 \pm 3.17\%$ , respectivement. Tandis que, les faibles concentrations des deux extraits n'ont aucun effet sur le taux de cette cytokine.



**Figure 21.** Effet de l'extrait aqueux (EA) et de l'extrait éthanolique (EE) de *S. chamaecyparissus* sur la production des cytokines. **A** : TNF- $\alpha$  **B** : IL-1 $\beta$  **C** : IL-10 et **D** : IL-8. Les mononucléaires périphériques ( $4 \times 10^5$  cellules/puits) traitées ou non par différentes concentrations (1, 10, 50 et 100  $\mu\text{g/ml}$ ) d'extrait sont stimulées par 5 $\mu\text{g/ml}$  de concanavaline A. puis incubées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> pendant une nuit. Après centrifugation, les surnageants sont récoltés afin d'effectuer le dosage des cytokines par le test ELISA. Les valeurs présentent la moyenne  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$  et \* :  $p < 0.05$ ; vs. le contrôle.

## D/ Effet sur IL-8

L'IL-8 est la cytokine la plus sécrétée par les mononucléaires périphériques. Les résultats obtenus montrent que 5 µg/ml de Concavalline A induisent une sécrétion très importante de cette chémokine ( $3456.96 \pm 61.18$  pg/ml). Le taux de l'IL-8 est hautement réduit ( $p < 0.001$ ) par le traitement avec les différentes concentrations (1, 10, 50 et 100 µg/ml) des deux extraits de *S. chamaecyparissus*. Les concentrations de 10 et 1 µg/ml de l'EA sont plus efficaces que celles de l'EE. En effet, 10 µg/ml de l'EA diminue la sécrétion de l'IL-8 à  $1964.82 \pm 152.83$  pg/ml, ceci correspond à un pourcentage d'inhibition de  $43.16 \pm 5.15\%$  (**figure 20D**).

### 6.2.2. Effet stabilisant de la membrane plasmique

Les résultats montrent que le milieu hypotonique induit une altération de la membrane plasmique des érythrocytes humains, conduisant à l'hémolyse des hématies.

Le traitement par les extraits de *S. chamaecyparissus* (1 mg/ml) protège de manière hautement significative ( $p < 0.001$ ) les érythrocytes contre l'hémolyse induite par le milieu hypotonique (**tableau 9**). Le traitement par l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux entraîne donc une certaine stabilité de la membrane plasmique.

**Tableau 9.** Effet protecteur de l'EA et l'EE contre l'hémolyse des hématies humaines induites par l'hypotonie du milieu. L'aspirine est utilisée comme référence.

Traitement	Absorbance à 540 nm	Inhibition (%)
Contrôle	$0.915 \pm 0.009$	/
Aspirine (0.1 mg/ml)	$0.849 \pm 0.017$	$6.41 \pm 1.91$
EA (1 mg/ml)	$0.445 \pm 0.030$	$51.07 \pm 0.55$ ***
EE (1 mg/ml)	$0.359 \pm 0.038$	$59.74 \pm 3.44$ ***

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\*:  $p < 0.001$  vs. le contrôle.

# Discussion

## 1. Extraction et analyse phytochimique des extraits de *S. chamaecyparissus*

Les extraits de *S. chamaecyparissus* sont obtenus à partir de la poudre de la partie aérienne de la plante séchée à l'ombre. Le séchage de la plante ne permet plus aux cellules végétales d'avoir des réactions enzymatiques ou métaboliques. Ceci démontre l'utilité du séchage du moment que les flavonoïdes (particulièrement les glycosylés) peuvent être soumis à une dégradation enzymatique quand le matériel végétal est frais ou non séché (Marston et Hostettmann, 2006). Le broyage de la plante a pour but d'améliorer l'extraction du fait qu'il rend l'échantillon plus homogène, augmente la surface du contact avec le solvant et facilite sa pénétration à l'intérieur des cellules qui ne sont pas détruites après le broyage. L'efficacité de l'extraction est influencée par la nature chimique des substances phytochimiques, la méthode d'extraction utilisée, la dimension des particules de l'échantillon, le solvant utilisé, ainsi que la présence de substances interférentes (Stalikas, 2007). Dans notre étude, la préparation des extraits bruts a été effectuée par macération dans l'éthanol et la par décoction. Le déroulement de la macération sous agitation pendant 24h et à température ambiante permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leur altération ou modification probable par la température élevée. Néanmoins, l'extraction aqueuse est faite par décoction à température élevée pendant 20 min. En fait, Su et ses collaborateurs (2006) ont rapporté que le rendement des extractions aqueuses augmente avec la température. Cela est expliqué par le fait que l'eau à haute température provoque la perturbation des cellules en facilitant la pénétration du solvant et la solubilisation des molécules (Albano et Miguel, 2011). La chaleur peut, cependant, conduire à la dégradation des molécules thermolabiles (Seidel, 2005), c'est la raison pour laquelle, la décoction a été effectuée pendant un temps court.

Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été réalisé par des méthodes colorimétriques; le Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium respectivement. Ces deux méthodes sont considérées comme les meilleures méthodes de détermination des polyphénols et des flavonoïdes des extraits de plantes (Djeridane *et al.*, 2010), car elles sont simples et reproductibles. Les résultats montrent que l'extrait éthanolique contient une teneur plus élevée en polyphénols et en flavonoïdes par rapport à l'extrait aqueux. En effet, les solvants organiques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Mahmoudi *et al.* (2013) et Talbi *et al.* (2015).

L'analyse phytochimique par HPLC couplé à la spectrométrie de masse a révélé la présence de plusieurs flavonoïdes et d'acides phénoliques tels que l'apigénine et l'acide

chlorogénique, comme majeurs constituants. Certains composés qui sont présents dans l'extrait éthanolique en faible concentration sont absents dans l'extrait aqueux. La solubilité de ces métabolites secondaires est plus élevée dans les solvants organiques que dans l'eau (Mahmoudi *et al.*, 2013). Ceci peut expliquer la différence entre la teneur en acides phénoliques et flavonoïdes dans les deux extraits de *S. chamaecyparissus*.

## 2. Activité hépatoprotectrice des extraits de *S. chamaecyparissus*

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

La présente étude a pour but d'évaluer l'activité hépatoprotectrice d'extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus*, une plante médicinale largement utilisée dans tout le nord d'Afrique pour soulager les douleurs abdominales et les désordres d'origine inflammatoire.

Pour déterminer l'innocuité de ces extraits, l'évaluation de l'effet toxique est réalisée chez le rat pour choisir la dose convenable. L'observation du comportement général des animaux constitue l'un des paramètres critiques pour l'évaluation des premiers signes de toxicité (Mansour *et al.*, 2014 ; Lima *et al.*, 2016 ; Sarhadynejad *et al.*, 2016). La présente étude montre que les deux extraits n'exercent aucun effet toxique pendant 14 jours d'observation. Pour l'étude de l'activité hépatoprotectrice des extraits de *S. chamaecyparissus*, deux modèles très utilisés (Mayuren *et al.*, 2010) où d'hépatotoxicité est induite par le CCl<sub>4</sub> et le paracétamol ont été utilisés.

Le CCl<sub>4</sub> est métabolisé en radicaux libres qui réagissent avec les macromolécules cellulaires, protéines, ADN et lipides membranaires. Par conséquent, les attaques de ces radicaux provoquent une toxicité aiguë et chronique du foie, conduisant à une stéatose, une nécrose, une fibrose et une cirrhose (Weber *et al.*, 2003). L'excès de ces radicaux réactifs, en particulier le CCl<sub>3</sub>• provoque la peroxydation des lipides membranaires conduisant ainsi à un relargage des transaminases (ALT, AST), PAL, bilirubine et LDH (Kumawatet *et al.*, 2012 ; Hurkadale *et al.*, 2012). De plus, ces radicaux réduisent les taux d'enzymes antioxydantes conduisant à un stress oxydant, ce qui est un facteur important dans les lésions aiguës et chroniques dans divers tissus (Singh *et al.*, 2015).

A des doses élevées, le paracétamol (PCM) devient toxique et peut induire une nécrose hépatique fatale (Gujrati *et al.*, 2007). En effet, à forte doses il est oxydé par le cytochrome P-

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

La toxicité induite chez les rats par le CCl<sub>4</sub> et le paracétamol, ainsi que l'effet hépatoprotecteur d'extraits de *S. chamaecyparissus* sont estimés via l'évaluation des paramètres biochimiques et histologiques.

## 2.1. Effet des extraits de *S. chamaecyparissus* sur les paramètres biochimiques

Le degré de la toxicité développée chez les rats des deux modèles d'hépatotoxicité est estimé par l'évaluation des paramètres biochimiques sériques (ALT, AST, PAL, LDH, bilirubine totale, triglycérides, cholestérol, urée et créatinine), des marqueurs antioxydants endogènes (SOD et catalase), du marqueur de la lipoperoxydation (MDA) et par observation des coupes histologiques du foie.

Le taux des transaminases hépatiques ALT et AST constitue un bon moyen de détection de l'hépatotoxicité. L'ALT est un indicateur sensible des atteintes hépatiques aiguës et l'élévation de cette enzyme dans les maladies non hépatiques est inhabituelle. De ce fait, l'ALT est donc le meilleur paramètre pour détecter une lésion hépatique (Fiedman et Keefe, 2004 ; Nkosi *et al.*, 2005).

Les résultats de cette étude montrent que l'intoxication des rats par le CCl<sub>4</sub> ou le paracétamol provoque une augmentation considérable des taux de transaminases hépatiques (ALT et AST), de la phosphatase alcaline et de la lactate deshydrogénase. Ceci serait dû à la présence de lésions hépatocellulaires. Dans une lésion hépatique, la fonction des hépatocytes est perturbée, en provoquant un niveau enzymatique accrue dans le sérum (Rajagopalet *al.*, 2003). Cette augmentation est due à une élévation de la fragilité de la membrane plasmique des hépatocytes, ce qui conduit à la libération des enzymes intracellulaires dans la circulation sanguine (Lin *et al.*, 2008). En outre, les perturbations des fonctions hépatiques causées par le

CCl<sub>4</sub> et le paracétamol peuvent expliquer l'augmentation du taux de ces enzymes (Subramanian *et al.*, 2013 ; Abirami *et al.*, 2015).

L'élévation du taux sérique de la phosphatase alcaline, qui est normalement libérée dans la bile, peut résulter d'un endommagement (Farida *et al.*, 2012) ou d'une obstruction des voies biliaires (Girish et Pradhan, 2012).

La lactate déshydrogénase est un marqueur de dégénérescence cellulaire, utilisé pour évaluer la fonction hépatique. L'augmentation du taux de cette enzyme intracellulaire dans le sérum des rats intoxiqués reflète l'endommagement des membranes de cellules hépatiques (Kim *et al.*, 2001).

L'élévation de la bilirubine dans la circulation sanguine pourrait être attribuée à une synthèse élevée, l'augmentation de l'hémolyse, la diminution de la conjugaison ou à l'altération du transport (Sasidharan *et al.*, 2010). Et par conséquent, la bilirubine est utilisée comme indicateur pour évaluer la fonction sécrétoire des hépatocytes (Al-Harbi *et al.*, 2014).

Bien que le foie soit la principale source de la plupart des protéines sériques, les résultats du modèle de CCl<sub>4</sub> ne révèlent aucun changement dans le taux des protéines y compris l'albumine. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Mihailovic et ses collaborateurs (2013). Par contre une diminution significative dans le taux des protéines totaux est observée dans le modèle de paracétamol. Ces résultats sont également en accord avec d'autres études montrant que le métabolisme protéique est altéré par le CCl<sub>4</sub> et le paracétamol. Ceci pourrait être attribué à la diminution de la synthèse protéique par les hépatocytes après une lésion cellulaire (Salem *et al.*, 2015 ; El-bakry *et al.*, 2016 ; Hena *et al.*, 2016).

Le taux des triglycérides et du cholestérol a augmenté de façon significative sous l'effet du CCl<sub>4</sub> et du paracétamol. Ceci témoigne de la présence de perturbations des mécanismes d'association des triglycérides avec l'apoprotéine approprié pour former la molécule porteuse lipoprotéine (Tiwari *et al.*, 2014 ; Shanmugam *et al.*, 2016). De même, le taux d'urée et de créatinine ont augmenté sous l'effet de CCl<sub>4</sub> et de paracétamol, indiquant un catabolisme accru des protéines et/ou un problème de sécrétion au niveau des hépatocytes (de Andrade Belo *et al.*, 2012 ; Shakya *et al.*, 2012). En effet, Saba et ses collaborateurs (2010) ont démontré que l'augmentation du taux de ces deux paramètres est due à l'activation du catabolisme des protéines au cours de l'hépatotoxicité.

Le traitement par l'EA et l'EE réduit le taux des transaminases, PAL, LDH. Ceci indique que ces extraits protègent les hépatocytes contre les attaques des radicaux libres et diminuent les fuites d'enzymes intracellulaires, en préservant la membrane plasmique. En effet, il a été rapporté que les extraits de plantes comme *Boerhaavia diffusa* diminuent le taux des transaminases hépatiques, d'ALP, de la bilirubine et de la LDH chez les rats intoxiqués par le

paracétamol (Olaleye *et al.*, 2010). Tiwari et ses collaborateurs (2014) ont montré que l'AST, l'ALT, la PAL et la bilirubine totale augmentent de façon significative après l'administration du paracétamol. Cette augmentation est normalisée par le traitement avec les extraits de *Selaginella lepidophylla*. De même, il a été rapporté que des extraits de *Sesbania grandiflora* induisent la diminution d'AST, d'ALT et de l'ALP chez les rats intoxiqués par l'injection intrapéritonéale du CCl<sub>4</sub> (Kale *et al.*, 2012).

Le taux d'urée et de créatinine adiminué sous l'effet du traitement par les deux extraits de *S. chamaecyparissus*. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Saba et ses collaborateurs (2010), qui ont montré que l'extrait aqueux des feuilles de *Cnidocolus aconitifolius* diminue le taux de ces deux paramètres.

Le traitement par les deux extraits de *S. chamaecyparissus* réduit le taux des triglycérides et de cholestérol. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Shanmugam et ses collaborateurs (2016). En effet, ces auteurs ont démontré que l'extrait acétonique des feuilles de *Passiflorasubpeltata* diminue le taux de ces deux paramètres lipidiques en utilisant le modèle de paracétamol. Gnanadesigan et ses collaborateurs (2016) ; ont montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *Ceriops decandradiminue* le taux des triglycérides et de cholestérol dans le modèle de CCl<sub>4</sub>.

En outre, Dey et ses collaborateurs (2015) ont montré que le CCl<sub>4</sub> induit une élévation d'AST, d'ALT, de PAL, de glucose, de protéine, d'albumine, de globuline, de bilirubine, d'urée, de LDH et de cholestérol, qui sont considérablement normalisés par l'extrait des feuilles de *Nerium indicum*.

Le métabolisme du CCl<sub>4</sub> et du paracétamol conduit à la formation des radicaux libres qui attaquent les lipides membranaires du réticulum endoplasmique. Ces attaques radicalaires sont responsables de la diminution des fonctions métaboliques tels que la synthèse des protéines et l'inhibition du stockage du cholestérol (Vermaet *al.*, 2015). La peroxydation des lipides membranaires conduit aussi au relargage des transaminases (ALT, AST), PAL, bilirubine et LDH (Kumawatet *al.*, 2012 ; Hurkadale *et al.*, 2012).

L'effet hépatoprotecteur des extraits de plantes semble être dû aux propriétés de piégeage des radicaux libres, ce qui conduit à l'inhibition de la peroxydation lipidique et la préservation de la membrane cellulaire (Ajithet *al.*, 2011).

Les effets exercés par les extraits de *S. chamaecyparissus* sont semblables à ceux exercés par le silymarin, utilisé comme hépato-protecteur de référence. Ce composé est extrait à partir des graines de *Silybum marianum* et constitué de plusieurs flavonoides y compris silybin A, silybin B, isosilybin, silychristin (Aghazadeh *et al.*, 2011). L'activité hépatoprotectrice du

silymarin est associée à sa capacité d'agir en tant que piègeur de radicaux, protégeant ainsi la perméabilité membranaire (Podder *et al.*, 2012).

## 2.2. Effet des extraits de *S. chamaecyparissus* sur les paramètres antioxydants

L'effet de 2 extraits sur le MDA, la catalase et la SOD est évalué au niveau du surnageant du foie des rats.

La concentration du MDA hépatique a augmenté suite à l'intoxication par CCl<sub>4</sub> et le paracétamol. Cette augmentation reflète un puissant stress oxydant qui conduit à des lésions tissulaires et une défaillance des mécanismes de défense antioxydante. Le MDA est considéré comme un marqueur de la peroxydation des lipides. Il peut pénétrer dans la bicouche lipidique membranaire, conduisant à l'endommagement ou à la perte de fonction de la membrane par durcissement. Ce durcissement réduit la fluidité et augmente la perméabilité de la membrane plasmique, induisant ainsi le gonflement et la nécrose cellulaire (Su *et al.*, 2016). La présente étude montre que le taux de MDA hépatique a diminué de façon significative par l'administration des extraits de *S. chamaecyparissus*. L'EA exerce un effet plus prononcé dans les deux modèles d'hépatotoxicité. Cet effet est très proche ou mieux que celui obtenu par le silymarin, utilisé comme hépatoprotecteur de référence. Ces résultats prouvent que l'EA et même l'EE peuvent protéger le foie contre les endommagements. Cette protection serait due à l'inhibition de la peroxydation lipidique et l'inhibition des réactions d'oxydation en chaîne (Goel *et al.*, 2005).

Le taux de la catalase et de la SOD a été réduit par le CCl<sub>4</sub> et le paracétamol. Les radicaux libres produits au cours du métabolisme de ces deux hépatotoxines réduisent les taux d'enzymes antioxydants conduisant à un stress oxydant, qui est un facteur important dans les lésions hépatiques (Singh *et al.*, 2015).

Le traitement avec les extraits de *S. chamaecyparissus* restaure l'activité de ces enzymes antioxydantes. Ces résultats sont en accord avec ceux de Shanmugam et ses collaborateurs (2016) qui ont montré que le traitement des rats avec l'extrait acétonique des feuilles de *Passiflora subpeltata* restaure le taux des enzymes antioxydants (SOD, catalase, et GPX). Cette restauration aboutit à la diminution de la peroxydation des lipides et par conséquent à la réduction des lésions hépatiques. En effet, la diminution de l'activité de ces enzymes est à l'origine de l'augmentation de la lipoperoxydation dont le produit final est le MDA. Ce dernier provoque la perte de fluidité et d'intégrité membranaire et finalement la perte des fonctions des hépatocytes (Halliwell, 2001).

### 2.3. Effet des extraits de *S. chamaecyparissus* sur l'aspect histologique du foie

L'étude histopathologique des coupes hépatiques des rats intoxiqués par le CCl<sub>4</sub> et le paracétamol ont fourni des preuves en faveur des analyses biochimiques précédentes. En effet, l'examen des coupes du foie a montré que l'intoxication des rats par le CCl<sub>4</sub> et le paracétamol provoque des lésions hépatiques, telles que la déformation massive de l'architecture du tissu hépatique, la stéatose et la nécrose.

Le traitement par les extraits de *S. chamaecyparissus* réduit ces lésions et protège significativement la morphologie des hépatocytes en régénérant les cellules du parenchyme hépatique et en les protégeant contre la fragilité des membranes cellulaires. Cet effet hépatoprotecteur des extraits de *S. chamaecyparissus* pourrait être dû aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires et à l'effet stabilisant de la membrane plasmique. En effet, récemment Boudoukha et ses collaborateurs (2015) ont rapporté que les extraits de *S. chamaecyparissus* sont doués d'un effet anti-inflammatoire et immunomodulateur.

Tous les effets hépatoprotecteurs rapportés dans le présent travail peuvent être dûs à la présence de composés bioactifs dans les extraits étudiés. En effet, l'analyse phytochimique par HPLC-TOF/MS a révélé la présence d'acides phénoliques tels que l'acide chlorogénique et de flavonoïdes tels que la rutine et l'apigénine. Plusieurs études ont démontré l'effet hépatoprotecteur de la rutine (Hafez *et al.*, 2015), l'apigénine-glycosides (Gupta *et al.*, 2011) et de l'acide chlorogénique (Wu *et al.*, 2015). La rutine augmente le taux d'enzymes antioxydantes hépatiques telles que la catalase, la SOD, la GPX, la glutathion-S-transférase, la GR, et diminue la peroxydation lipidiques (Murlidhar *et al.*, 2010).

### 3. Activité anti-oxydante des extraits de *S. chamaecyparissus*

Le stress oxydant est l'un des mécanismes impliqués dans l'hépatotoxicité induite par le CCl<sub>4</sub> et le paracétamol, qui provoque la désintégration de la membrane, la perte des enzymes et la nécrose qui à long terme peut évoluer en cirrhoses. L'activité hépatoprotectrice des extraits de *S. chamaecyparissus* pourrait être associée en grande partie aux propriétés antioxydantes. En effet, le piégeage des radicaux libres constitue un mécanisme important d'anti-oxydation qui peut protéger contre les endommagements tissulaires induits par le stress oxydant. Pour cette raison, l'activité anti-oxydante des extraits de *S. chamaecyparissus* est examinée *in vitro*.

Le plus souvent, des tests différents et complémentaires sont réalisés pour avoir une indication sur la capacité antioxydante des substances à tester (Hua *et al.*, 2008 ; Tabart *et al.*, 2009). De ce fait, l'effet antioxydant des extraits de *S. chamaecyparissus* est évalué dans la

présente étude par plusieurs tests à savoir le test de DPPH, le pouvoir réducteur, la chélation de fer ferreux, le blanchissement de la  $\beta$ -carotène, l'oxydation d'ADN et des protéines.

### 3.1. Activité anti radicalaire

L'activité antioxydante des extraits éthanolique et aqueux de *S. chamaecyparissus* vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée en suivant la réduction du radical DPPH. La molécule antioxydante peut neutraliser les radicaux DPPH en fournissant un atome d'hydrogène ou un électron (Que *et al.*, 2006). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance à 517 nm (Majhenic *et al.*, 2007).

Les deux extraits de *S. chamaecyparissus* ont montré une activité de piégeage de radicaux libres meilleure que celle obtenue avec le BHT, utilisé comme anti-oxydant standard. Cette activité antiradicalaire serait probablement due aux composés polyphénoliques, connus par leurs activités antioxydantes (Almaraz-Abarca *et al.*, 2007 ; Vukics *et al.*, 2008). En fait, il existe une corrélation entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante (Zhao *et al.*, 2014). L'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement attribué à leur propriété d'oxydo-réduction, qui peut jouer un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres par leur capacité de donation d'hydrogène (Prasad *et al.*, 2010).

### 3.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur exprime la capacité d'un composé à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par donation d'un électron. Les deux extraits de *S. chamaecyparissus* exercent un effet réducteur. Cependant, l'extrait éthanolique a un pouvoir réducteur plus puissant que celui de l'extrait aqueux. Ce pouvoir est probablement dû à la présence de molécules ayant une capacité réductrice qui inhibe les réactions en chaînes déclenchées par les radicaux libres. Cette inhibition est effectuée par le don d'un atome d'hydrogène ou d'électron (Prasad *et al.*, 2010). Les flavonoïdes sont bien connus par leur capacité à donner des électrons (Cook et Samman, 1996 ; Lemanska *et al.*, 2001 ; Le *et al.*, 2007). Nos extraits contiennent plusieurs flavonoïdes y compris la rutine, qui dispose d'un pouvoir réducteur très puissant (Lue *et al.*, 2010). Ces extraits sont aussi riches en acides phénoliques, qui peuvent réduire les radicaux libres et les transformer en produits plus stables en bloquant les réactions en chaîne de l'oxydation (Sasikumar *et al.*, 2010).

### 3.3. Effet chélateur du fer ferreux

Les ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) sont capables de participer à la génération des radicaux libres à partir des peroxydes par la réaction de Fenton. De ce fait, ces ions font partie des pro-oxydants les plus puissants à cause de leur réactivité élevée (Gülçinet *et al.*, 2010). Ainsi, les antioxydants capables de chélater ces ions peuvent minimiser leur concentration et inhiber leur capacité à catalyser la formation des radicaux libres et protéger les cellules contre les endommagements induits par le stress oxydant (Wu *et al.*, 2006).

Dans cette étude, l'activité chélatrice des extraits de *S. chamaecyparissus* est estimée en utilisant la ferrozine qui chélate les ions  $\text{Fe}^{2+}$ , formant ainsi un complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozine de couleur rouge. En présence d'autres agents chélateurs, la formation du complexe est interrompue et par conséquent l'intensité de la couleur diminue (Yamaguchi *et al.*, 2000). Les deux extraits de *S. chamaecyparissus* présentent une considérable activité chélatrice. Toutefois, l'extrait aqueux de *S. chamaecyparissus* est meilleur que l'extrait éthanolique. Ceci pourrait être attribué à la solubilité des agents chélateurs dans l'eau. Sahreen et ses collaborateurs (2010) ont montré que les extraits des plantes induisent des effets chélateurs de manière directement proportionnelle à la polarité de leurs solvants. Les groupements hydrosolubles possèdent un caractère nucléophile élevé qui leur confère la capacité chélatrice (Ozen *et al.*, 2011). Les constituants aqueux sont plus capables d'inhiber la formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozine, en capturant les ions ferreux avant la ferrozine. Il a été rapporté que les agents chélateurs sont efficaces comme antioxydants secondaires car ils réduisent le potentiel redox en stabilisant la forme oxydée des ions métalliques (Gülçinet *et al.*, 2007). Cette activité antioxydante secondaire empêche la génération des radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton. Les ions métalliques sont en grande partie séquestrés *in vivo* mais une capacité élevée de chélation d'ions ferreux par les antioxydants empêche d'aggraver certaines maladies associées aux ions métalliques (Cao *et al.*, 1997) telle que les maladies neurodégénératives (Dusek *et al.*, 2016).

### 3.4. Effet sur la peroxydation des lipides

La peroxydation lipidique est une altération oxydative des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires, catalysée par les radicaux libres (Bougatef *et al.*, 2009). Ainsi, l'acide linoléique pourrait servir comme modèle d'acides gras trouvés dans les membranes. Afin de déterminer la capacité des extraits à diminuer la peroxydation lipidique causée par les radicaux libres, le test du blanchissement de  $\beta$  carotène a été utilisé. Le mécanisme de blanchissement de la  $\beta$ -carotène dépend des radicaux hydroperoxydes résultants de l'oxydation de l'acide linoléique. Ces radicaux oxydent par la suite la  $\beta$ -carotène, entraînant ainsi la disparition de sa

couleur orange. Cette disparition est suivie à 470 nm. Toutefois, la présence d'un antioxydant dans le milieu réactionnel pourrait soit inhiber l'oxydation de l'acide linoléique soit neutraliser les radicaux libres, ou les deux en même temps (Naidu *et al.*, 2011).

Le blanchissement de la  $\beta$ -carotène a été fortement ralenti en présence des deux extraits de *S. chamaecyparissus*. Cependant, l'extrait aqueux exerce un effet plus prononcé que l'extrait éthanolique. Les extraits de *S. chamaecyparissus* ont une capacité de réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne de réactions radicalaires. Les flavonoïdes et les polyphénols d'une manière générale ont la capacité de piéger les radicaux libres et par conséquent, retarder l'auto-oxydation des lipides (Gao *et al.*, 2000). Ils inhibent la peroxydation lipidique en un stade précoce en scavengant les radicaux peroxydes, comme ils peuvent interrompre la chaîne de réactions radicalaires en donnant de l'hydrogène (Sandhar *et al.*, 2011).

Cette capacité de modifier la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres est reliée non seulement aux caractéristiques structurales des agents antioxydants mais aussi à leur capacité d'interagir avec eux et à pénétrer dans les bicouches lipidiques (Saija *et al.*, 1995). Il a été démontré que la structure et la lipophilie des polyphénols sont des facteurs favorisant la propriété anti-oxydante, probablement en facilitant l'incorporation de ces composés dans la phase lipidique de la membrane (Djeridane *et al.*, 2010).

Liu *et al.* (2008), ont montré que les concentrations et les combinaisons particulières des antioxydants ont une activité supérieure à celle des molécules pures. Ce qui peut expliquer l'effet des extraits étudiés par rapport aux molécules pures telles que le BHT.

### 3.5. Effet sur l'oxydation d'ADN

Les radicaux  $\text{OH}\cdot$  sont générés expérimentalement par le système de photolyse  $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ . Ces radicaux se lient à l'ADN et réagissent avec les bases azotées produisant des radicaux basiques et des radicaux de sucres (Bernhard et Close, 2004 ; Cadet et Wagner, 2016). Par conséquent, l'abstraction de l'atome d'hydrogène du désoxyribose par le radical  $\text{OH}\cdot$  conduit à la rupture du brin d'ADN au niveau de la liaison phosphodiester liant le phosphate et le désoxyribose, la fragmentation du désoxyribose et la modification des bases nucléotidiques (Knapp-Pogozelski et Tullius, 1998 ; Cadet et Wagner, 2016).

Dans cette étude, l'activité des extraits de *S. chamaecyparissus* à protéger l'ADN de l'endommagement oxydatif est évaluée en utilisant l'ADN plasmidique pBluescript M13+ d'*E. coli*.

Lorsque l'ADN est intact, il se présente sous une forme superenroulée, mais s'il subit une coupure, il y a relaxation de la superhélice et l'ADN passe à une forme circulaire relâchée. Une coupure double brin peut également être à l'origine de la linéarisation de l'ADN (Rudiuk, 2009). Kizil et ses collaborateurs (2011) ont montré que l'ADN plasmidique pBluescript M13+ présente deux bandes sur le gel d'électrophorèse; la bande qui se déplace rapidement, correspondant à la forme native d'ADN circulaire superenroulé (ADNcs) et l'autre bande est la forme détendue (ouverte) circulaire (ADNoc). L'irradiation du plasmide par les UV en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne le clivage de l'ADNcs en forme linéaire (ADNlin), indiquant que les radicaux OH<sup>•</sup> générés par la photolyse ont produit une scission des brins d'ADN.

La présente étude a montré l'efficacité des deux extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus* à protéger l'ADN plasmidique contre les coupures induites par le système UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisée par Verma et ses collaborateurs (2015) qui ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Carissa carandas* protège complètement l'ADN plasmidique pBR322 du stress oxydant induit par le système de photolyse UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Une autre étude comparative menée par Guha et ses collaborateurs (2011) a montré que les différents extraits des différentes plantes étudiées ont protégé l'ADN contre l'oxydation. De même, Kalita et ses collaborateurs (2012) ont rapporté que l'extrait aqueux des feuilles de *Lantana camara* protège l'ADN plasmidique pBR322 contre l'endommagement induit par le système UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les antioxydants naturels comme les polyphénols et les flavonoïdes peuvent influencer le processus d'oxydation par l'inhibition des réactions radicalaires en chaînes, la liaison des catalyseurs d'ions métalliques de transition, la décomposition des peroxydes, la prévention de donation des atomes d'hydrogène et le piégeage des radicaux libres (Ames *et al.*, 1993 ; Mayakrishnan *et al.*, 2012 ; Sowndhararajan et Kang, 2013 ; Tan et Lim, 2015 ; Mohajer *et al.*, 2016).

### 3.6. Effet sur l'oxydation de protéine

Les radicaux hydroxyles attaquent les protéines en enlevant l'atome d'hydrogène du carbone  $\alpha$  du squelette polypeptidique. Le radical résultant réagit rapidement avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde. En présence de Fe<sup>2+</sup> ou de HO<sub>2</sub><sup>•</sup>, l'hydroperoxyde se transforme en radical alkoxyde. Ce radical peut donner des dérivés carbonyles (Stadtman, 2006 ; Höhn *et al.*, 2013). Les résidus tryptophane, histidine et cystéine sont les plus particulièrement susceptibles à l'attaque oxydante. L'oxydation de ces résidus peut également donner des dérivés carbonyles (Dalle-Donne *et al.*, 2003 ; Kizil *et al.*, 2011). Les protéines

affectées perdent leur fonctions ce qui entraîne la perturbation des fonctions cellulaires (Höhn *et al.*, 2013).

Dans la présente étude, l'oxydation de l'albumine est induite par le système  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$ /acide ascorbique, entraînant la formation des radicaux hydroxyles. L'acide ascorbique réduit le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), ce qui peut régénérer les radicaux hydroxyles (Emen *et al.*, 2009).

Les deux extraits de *S. chamaecyparissus* diminuent l'oxydation de l'albumine d'une manière concentration-dépendante. L'inhibition de l'oxydation des protéines par ces extraits est due au piégeage des radicaux hydroxyles générés par le système  $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /acide ascorbique. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Kizil et ses collaborateurs (2011) qui ont montré que les extraits éthanolique de *Hypericum scabrum* et *Hypericum retusum* acher protègent l'albumine contre la dégradation induite par  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$ /acide ascorbique, suggérant un effet protecteur via des propriétés de piégeage des radicaux libres générés par le système  $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /acide ascorbique. L'étude menée par Samudram et ses collaborateurs (2009) a montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *Melia azedarach* et des graines de *Piper longum* inhibe l'oxydation de l'albumine grâce à leurs contenus riches en antioxydants.

## 4. Activité anti-inflammatoire des extraits de *S. chamaecyparissus*

### 4.1. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton

L'application topique d'un agent irritant comme l'huile de croton sur l'oreille de la souris induit une augmentation de l'épaisseur de l'oreille. Dans ce modèle d'inflammation aigue, la réponse induite par l'huile de croton est caractérisée par un œdème provoqué par une vasodilatation et infiltration de leucocytes, et plusieurs médiateurs inflammatoires sont libérés (Chen *et al.*, 2012 ; Chibli *et al.*, 2014). L'étude réalisée par Lawrence et ses collaborateurs (2002) a montré que dans les 30 premières minutes, des amines vasoactives (histamine et sérotonine) sont libérées et sont responsables de la formation de l'œdème. Cependant, la migration des neutrophiles est mise en évidence environ 1 h après l'irritation (Calder, 2006; Nicolaou *et al.*, 2011).

Ces événements sont évoqués par la phosphorylation de la protéine kinase C (PKC) et l'activation subséquente de la phospholipase A2 (PLA2). L'activation de la PLA2 initie la cascade du métabolisme de l'acide arachidonique et par conséquent, les leucotriènes, les prostaglandines et les cytokines sont produits. La production de ces médiateurs chimiques

conduit à l'installation du processus inflammatoire (Cuzzocrea *et al.*, 1998 ; Cabrini *et al.*, 2011 ; Domiciano *et al.*, 2013).

Le 12-o-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) est le phorbol majeur de l'huile de croton, il est considéré comme le principal agent irritant. Le TPA est capable d'activer la PKC, qui à son tour active d'autres cascades enzymatiques comme la cyclooxygénase 2, la 5-lipoxygénase et l'oxyde nitrique synthase inductible (Aquila *et al.*, 2009). De plus, la protéine kinase C stimule divers médiateurs immunitaires qui augmentent et maintiennent la réponse inflammatoire (Kim *et al.*, 2013).

Le prétraitement local des souris avec les extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus* a significativement diminué la taille de l'œdème de l'oreille induit chez les souris. La meilleure inhibition est exercée par l'anti-inflammatoire standard (indométacine) suivie par l'EE et l'EA. Bidaut-Russell (2001) a rapporté que l'indométacine inhibe la cyclooxygénase 1 et 2 et par conséquent la formation d'œdème ainsi que la production des médiateurs pro-inflammatoires tels que TNF  $\alpha$ , IL-6 et PGE2.

L'activité observée avec les deux extraits étudiés est probablement due à la présence de substances lipophiles bioactives pouvant pénétrer à travers la barrière cutanée (Okoli *et al.*, 2007). Probablement, les candidats à cet effet anti-inflammatoire sont les flavonoïdes et les polyphénols (Gonzalez *et al.*, 2011 ; Zhong *et al.*, 2012).

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Meziti (2009), qui a démontré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Malva parviflora* diminue significativement l'œdème induit par l'huile de croton, tandis que l'extrait aqueux de la même plante n'a pas d'effet. Une autre étude réalisée par Bouriche et ses collaborateurs (2016) a montré que l'extrait méthanolique de *Hertia cheirifolia* diminue significativement l'épaisseur de l'oreille induit toujours par l'huile de croton. Effectivement, l'analyse phytochimique montre que cet extrait contient des composés phénoliques y compris la rutine. Selloum et ses collaborateurs (2003) ont démontré que la rutine possède des propriétés anti-inflammatoires en inhibant l'œdème de la patte chez le rat, le chimiotactisme et la dégranulation des neutrophiles.

## 4.2. Effet sur le recrutement des neutrophiles

Pour confirmer l'activité anti-inflammatoire des deux extraits de *S. chamaecyparissus* leur effet sur la migration des leucocytes vers le site enflammé, est testé en utilisant le modèle animal de la poche d'air induite par la carrageenane.

Les résultats de cette étude ont révélé que le traitement avec 1 mg d'extrait aqueux ou éthanolique réduit significativement le nombre de leucocytes infiltrés dans la cavité de la poche

d'air. L'inhibition exercée par l'extrait éthanolique est proche de celle obtenue avec 0.1 mg/poche d'indométacine. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Fedel-Miyasato et ses collaborateurs (2014). En effet, cette équipe a montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Schinus terebinthifolius* inhibe la migration des leucocytes et l'exsudation. De même, Bouriche et ses collaborateurs (2016) ont montré que l'extrait méthanolique de *Hertia cheirifolia* inhibe le recrutement des neutrophiles dans la cavité de la poche d'air. L'étude de Liz et ses collaborateurs (2011) a montré que l'extrait éthanolique brut d'*Esenbeckia leiocarpa* et ses fractions possèdent une efficacité anti-inflammatoire importante. Cette propriété est basée sur l'inhibition de la migration des leucocytes et la diminution de la concentration des protéines dans l'exsudat.

### 4.3. Effet sur la libération des cytokines

Dans le but d'examiner l'effet de *S. chamaecyparissus* sur la production de cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-8 et IL-10), les mononucléaires périphériques sont stimulés avec la Concavaline A en présence et en absence des deux extraits de *S. chamaecyparissus* à différentes concentrations. La concanavaleine A est un puissant mitogène utilisé le plus souvent pour induire la prolifération et la différenciation des leucocytes (Zhao *et al.*, 2010 ; Zhanget *al.*, 2011). Elle stimule les monocytes pour produire l'IL-1, par la suite l'IL-1 agit comme un co-stimulateur de la Concavaline A et induit l'activation des lymphocytes (Conti *et al.*, 1991).

Nos résultats montrent que les deux extraits de *S. chamaecyparissus* diminuent la production des cytokines pro-inflammatoires (l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-8) et n'ont aucun effet sur l'IL-10. Le taux de TNF- $\alpha$  est diminué par les concentrations élevées (50 et 100  $\mu$ g/ml) de l'EE et les concentrations faibles (1 et 10  $\mu$ g/ml) de l'EA. Cependant, le taux de la cytokine immunosuppressive (IL-10) est seulement diminué par les fortes concentrations (50 et 100  $\mu$ g/ml) des deux extraits étudiés. Ces résultats peuvent être exploités pour favoriser l'effet anti-inflammatoire, en utilisant des doses faibles des extraits pour diminuer les cytokines pro-inflammatoires sans affecter l'IL-10. En effet, Louis et ses collaborateurs (1997) ont démontré l'importance de l'IL-10 dans la protection du foie contre l'inflammation induite par le TNF- $\alpha$  et l'IL-12. Il a été également démontré que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  stimulent la migration des neutrophiles et l'activation des fibroblastes (Henry et Garner, 2003; Kondo et Ishida, 2010). Par conséquent, la mesure du taux d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  est utile pour le suivi de la progression des maladies inflammatoires (Smith *et al.*, 2004).

L'activité anti-inflammatoire des extraits de *S. chamaecyparissus* pourrait être due à la présence des composés bioactifs. L'acide chlorogénique et la rutine, détectés dans les deux extraits de *S. chamaecyparissus*, sont impliqués dans l'inhibition des facteurs de transcription inflammatoires (Palikova *et al.*, 2009; Zdarilova *et al.*, 2010). Hwang *et al.* (2014) ont démontré que l'acide chlorogénique, constituant majeur des deux extraits aqueux et éthanolique de *S. chamaecyparissus*, atténue les cytokines pro-inflammatoires l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ .

Les antioxydants peuvent réduire l'inflammation par l'inhibition des médiateurs pro-inflammatoires, ainsi que l'augmentation de la production des médiateurs anti-inflammatoires (Costa *et al.*, 2013 ; Moura *et al.*, 2015). Cette suggestion est accentuée par les résultats des tests antioxydants obtenus.

#### 4.4. Effet sur la stabilité de la membrane plasmique

Pour justifier le rôle des extraits étudiés dans la préservation de la membrane cellulaire, l'inhibition de la lyse membranaire des érythrocytes induite par l'hypotonie est vérifiée. L'exposition des érythrocytes aux substances nocives telles que le milieu hypotonique conduit à la lyse de la membrane, accompagnée par l'oxydation et la dégradation de l'hémoglobine (Mohamed Saleem *et al.*, 2011). Agarwal et ses collaborateurs (2003) ont également rapporté que la déstabilisation de la membrane cellulaire est attribuée à la production de radicaux libres, tels que les peroxydes de lipides. L'effet hémolytique de la solution hypotonique est lié à l'accumulation excessive des fluides à l'intérieur de la cellule entraînant la rupture de sa membrane. Une lésion au niveau de la membrane plasmique des hématies rendra la cellule plus sensible aux endommagements y compris la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres (Arzanlou *et al.*, 2011).

La présente étude montre que les deux extraits protègent la membrane érythrocytaire humaine contre la lyse induite par la solution hypotonique. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Debnath et ses collaborateurs (2013), qui rapportent que les différents extraits des feuilles de *Erioglossum rubiginosum* protègent la membrane érythrocytaire humaine contre la lyse. De même, Kumarappan et ses collaborateurs (2011) ont démontré la capacité des extraits éthanolique de *Gloriosa superba* et *Hydrocotyle javanica* à stabiliser la membrane des globules rouges.

Les deux extraits exercent probablement leur effet contre la lyse membranaire à travers leur activité anti-oxydante et anti-inflammatoire. La présence de flavonoïdes et de polyphénols dans les deux extraits pourrait être responsable de ces activités. Ghilissi et ses collaborateurs

(2016) ont démontré que les polyphénols contenus dans l'extrait aqueux des feuilles d'*Artemisia campestris* sont responsables de plusieurs activités y compris les activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes. De même, Francisco et ses collaborateurs (2013) ont rapporté l'activité anti-inflammatoire de l'acide polyphénolique, identifié dans les extraits étudiés. En fait, l'acide chlorogénique contribue fortement à l'effet inhibiteur de l'activité du protéasome qui contrôle l'activation du facteur de transcription NFκB. Une autre étude a révélé que l'ingestion de ce métabolite secondaire participe dans la prévention de l'inflammation des intestins (Shin *et al.*, 2015). De plus, il a été démontré que l'apigénine possède des activités antioxydante (Prince Vijeya Singh *et al.*, 2004; Stanojević *et al.*, 2009) et anti inflammatoire (Funakoshi-Tago *et al.*, 2011; Rithidech *et al.*, 2012).

## Conclusion et perspectives

Les extraits éthanolique et aqueux de *S. chamaecyparissus* protègent le foie contre les agressions induits par le paracétamol et le CCl<sub>4</sub>. Cette activité pourrait être attribuée aux propriétés anti-oxydante et anti-inflammatoire de cette plante. Les désordres fonctionnels et la destruction du parenchyme hépatique obtenus après exposition au CCl<sub>4</sub> et au paracétamol sont dûs à l'induction de la génération des radicaux libres et l'initiation de la réaction inflammatoire. L'étude phytochimique des deux extraits de *S. chamaecyparissus* a révélé la présence de plusieurs composés phénoliques. Ces métabolites secondaires, en présence d'autres composés présents dans les extraits peuvent améliorer les fonctions et l'état du parenchyme hépatique. Ainsi, l'étude de l'activité anti-oxydante *in vitro* de ces deux extraits a ciblé différents mécanismes y compris la capacité de piégeage des radicaux libres, l'aptitude à réduire le fer et la tendance à inhiber la peroxydation lipidique, et l'effet protecteur de ces extraits contre l'oxydation des protéines et d'ADN. En outre, ces deux extraits ont des effets anti-inflammatoires remarquables en stabilisant la membrane cellulaire et en inhibant l'œdème, la migration des leucocytes et la production des médiateurs pro-inflammatoire (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL-8) sans interférer avec la synthèse des cytokines anti-inflammatoire (IL-10).

L'amélioration de la structure histologique du foie, la réstoration des taux des enzymes hépatiques et d'autres indicateurs biochimiques reflètent l'effet hépatoprotecteur de la plante étudiée, cet effet serait probablement dû aux activités anti-oxydante et anti inflammatoire de ces composés.

Le présent travail prouve que l'utilisation de *S. chamaecyparissus* en médecine populaire pour le traitement des maladies du foie est justifiée. Cependant, des recherches complémentaires et approfondies sont à envisager. Les principales perspectives de recherche qui apparaissent à l'issue de cette thèse concernent l'étude à l'échelle cellulaire et moléculaires des substances identifiées des extraits de *S. chamaecyparissus* sur:

- les hépatocytes directement ;
- l'expression des gènes de cytokines pro-inflammatoires ;
- les enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques.

Références

Bibliographiques

## Références bibliographiques

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, (2012). Cellular and Molecular Immunology, seventh edition. ELSEVIER Saunders. pp56 – 85.
- Abboud G, Kaplowitz N, (2007). Drug-induced liver injury. *Drug Safety*, **30**, 277 – 294.
- Abirami A, Nagarani G, Siddhuraju P, (2015). Hepatoprotective effect of leaf extracts from *Citrus hystrix* and *C. maxima* against paracetamol induced liver injury in rats. *Food Sci Hum Wellness*, **4**, 35 – 41.
- Aebi H, (1984). Catalase *in vitro*. *Method Enzymol*, **105**, 121-126.
- Agarwal BA, Rangari VD, (2003). Anti-inflammatory and antiarthritic activities of Lupeol and 19 $\alpha$ -H lupeol isolated from *Strobilanthes callosus* and *Strobilanthes ixiocephala* roots. *Indian J Pharmacol*, **35**, 384 – 387.
- Aghazadeh S, Amini R, Yazdanparast R, Ghaffari SH, (2011). Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of *Silybum marianum* in treatment of experimental steatohepatitis. *Exp Toxicol Pathol*, **63**, 569 – 574.
- Ahuja A, Bakshi S K, Sharma S K, Thappa R K, Agarwal S G, Kichlu S K, Paul R and Kaul M K (2005). Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus* L. (cotton lavender). *Flavour Frag J*, **20**, 403 – 406.
- Ajith A, Hema U, Aswathy MS, (2011). *Zingiber officinale* Roscoe prevents acetaminophen induced acute toxicity by enhancing hepatic antioxidant status. *Food Chem Toxicol*, **45**, 2267 – 2272.
- Alam J, Mujahid Md, Badruddeen, Jahan Y, Bagga P, Azizur Rahman Md. (2017). Hepatoprotective potential of ethanolic extract of *Aquilaria agallocha* leaves against paracetamol induced hepatotoxicity in SD rats. *J Tradit Complement Med*, **7**, 9 – 13.
- Albano SM, Miguel MG, (2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Ind Crop Prod*, **33**, 338 – 343.
- Al-Harbi NO, Imam F, Nadeem A, Al-Harbi MM, Iqbal M, Ahmad SF, (2014). Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat is reversed by treatment with riboflavin. *Int Immunopharmacol*, **21**, 383–388.
- Almaraz-Abarca N, Campos MDG, Reyes JA, Jimenez NN, Corral JH, Gonzalez-Valdez LS, (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *J Food Compos Anal*, **20**, 119 – 124.
- Als-Nielsen B, Gluud LL, Gluud C, (2004). Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. *BMJ*, **328**, 1046 – 1051.
- Amathieu R, Levesque E, Merle JC, Chemit M, Costentin C, Compagnon P, Dhonneur G, (2013). Insuffisances hépatiques aiguës sévères d'origine toxique : prise en charge étiologique et symptomatique. *Ann Fr Anesth Reanim*, **32**, 416 – 421.

- Ames SN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993). Oxidant, antioxidant and degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 7915 – 7922.
- Amro BI, Haddadin RN, Tawaha K, Mohammad M, Mashallah S, Assaf MA, (2013). *In vitro* antimicrobial and anti-inflammatory activity of Jordanian plant extracts: a potential target therapy for Acne vulgaris. *Afr J Pharm Pharmacol*. **7**, 2087–2099.
- Andrade R, Lucena M, Fernandez M, Pelaez G, Pachkoria K, García-Ruiz E, García-Muñoz B, González-Grande R, Pizarro A, Durán JA, Jiménez M, Rodrigo L, Romero-Gomez M, Navarro JM, Planas R, Costa J, Borrás A, Soler A, Salmerón J, Martín-Vivaldi R, (2005). Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterol*, **129**, 512 – 521.
- Aquila S, Giner RM, Recio MC, Spegazzini ED, Rios JL, (2009). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. *J Ethnopharmacol*, **121**, 333 – 337.
- Arem AEI, Ghrairi F, Lahouar L, Thouri A, Saafi EB, Ayed A, Zekri M, Ferjani H, Haouas Z, Zakhama A, Achour L, (2014). Hepatoprotective activity of date fruit extracts against dichloroacetic acid-induced liver damage in rats. *J Funct Foods*, **9**, 119 – 130.
- Arii S, Imamura M, (2000). Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implications in the pathogenesis of liver injury. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, **7**, 40 – 48.
- Arzanlou M, Bohlooli S, Jannati E, Mirzanejad-Asl H, (2011). Allicin from garlic neutralizes the hemolytic activity of intra- and extracellular pneumolysin O *in vitro*. *Toxicon*, **57**, 540 – 545.
- Attaguile G, Russo A, Campisi A, Savoca F, Acquaviva R, Ragusa N, Vanella A, (2000). Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol Toxicol*, **16**, 83 – 90.
- Aubert J, Begriche K, Knockaert L, Robin MA, Fromenty B, (2011). Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, **35**, 630 – 7.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M, Gazin M, (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*, **46**, 1086 – 1089.
- Bajaj YPS, (1994). Biotechnology in agriculture and forestry 28, Medicinal and aromatic plants VII. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH. pp 412-425.
- Barrero AF, Mar Herrador M, Quilez JF, Alvarez- Manzaneda R, Portal D, Gavin J A, Gravalos DG, Simmonds MSJ, Blaney WM (1999). Bioactive sesquiterpenes from *Santolina rosmarinifolia* subsp. Canescens. A conformational analysis of the germacranolide ring. *Phytochemistry*, **51**, 529 – 541.
- Basu S, (2003). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology*, **189**, 113–127.

- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A, (2012). The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol*, **56**, 952 – 564.
- Begrache, K., J. Massart, Robin MA, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol*, **54**, 773 – 794.
- Bernhard WA, Close DM (2004). DNA damage dictates the biological consequences of ionizing irradiation: The chemical pathways in charged particle and photon, interaction with matter. Chemical, physiochemical, and biological consequences with applications. Marcel Dekker Inc pp. 431-469.
- Bhattacharyya S, Pence L, Beger R, Chaudhuri S, McCullough S, Yan K, Simpson P, Hennings L, Hinson J, James L, (2013). Acylcarnitine profiles in acetaminophen toxicity in the mouse: comparison to toxicity, metabolism and regeneration. *Metabolites*, **3**, 602 – 622.
- Bidaut-Russell M, (2001). Adverse gastrointestinal effects of NSAIDs: consequences and costs. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **15**, 739 – 753.
- Biour M, Ben Salem C, Chazouillères O, Grangé JD, Serfaty L, Poupon R, (2004). Drug-induced liver injury; fourteenth updated edition of the bibliographic database of liver injuries and related drugs. *Gastroenterol Clin Biol*, **28**, 720–759.
- Bjerring PN, Eefsen M, Hansen BA, Larsen FS, (2009). The brain in acute liver failure. A tortuous path from hyperammonemia to cerebral edema. *Metab Brain Dis*, **24**, 5–14.
- Boudjema K, Iderne A, Lutun P, Altieri M, Wolf P, Temp JD, Jaeck D, (1997). Hépatite fulminante et subfulminante. *Gastroenterol Clin Biol*, **21**, 412 – 422.
- Boudoukha C, Bouriche H, Ortega E, Senator A, (2015). Immunomodulatory effects of Santolina chamaecyparissus leaf extracts on human neutrophil functions. *Pharm Biol*, **54**, 667 – 673.
- Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M, (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem*, **114**, 1198 – 1205.
- Bouriche H, Kada S, Assaf AM, Senator A, Gul F, Dimertas I, (2016). Phytochemical screening and anti-inflammatory properties of Algerian *Hertia cheirifolia* methanol extract. *Pharm Biol*, **54**, 2584 – 2590.
- Browning JD, Horton JD, (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*, **114**, 147 – 152.
- Cabrini DA, Moresco HH, Imazu P, Silva CD, Pietrovski EF, Mendes DAGB, Pridente AS, Pizzolatti MG, Brighente MC, Otuki MF, (2011). Analysis of the potential topical anti-inflammatory activity of *Averrhoa carambola* L. in mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, 908059 doi:10.1093/ecam/neq026.
- Cadet J, Wagner JR, (2016). Radiation-induced damage to cellular DNA: Chemical nature and mechanisms of lesion formation. *Radiat Phys Chem*, **128**, 54–59.

- Calder PC, (2006). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **75**, 197–202.
- Cao G, Prior RL, Cutler RG, Yu BP, (1997). Effect of dietary restriction on serum antioxidant capacity in rats. *Arch Gerontol Geriatr*, **25**, 245 – 253.
- Chaumont JP, Millet-Clerc J, (2011). Phyto-aromathérapies appliquée à la dermatologie. Edition TEC&DOC, Lavoisier, pp 166 – 167.
- Chen BT, Li WX, He RR, Li YF, Tsoi B, Zhai YJ, Kurihara H, (2012). Anti-inflammatory effects of a polyphenols-rich extract from tea (*Camellia sinensis*) flowers in acute and chronic mice models. *Oxid Med Cell Longev* 537923 doi: 10.1155/2012/537923.
- Cherchi G, Deidda D, De Gioannis B, Marongiu B, Pompei R, Porcedda S, (2001). Extraction of *Santolina insularis* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flavour Frag J*, **16**, 35 – 43.
- Chibli LA, Rodrigues KC, Gasparetto CM, Pinto NC, Fabri RL, Scio E, Alves MS, Del-Vechio-Vieira G, Souza OV, (2014). Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *J Ethnopharmacol*, **154**, 330–338.
- Clément MA, (2015). Impact de l'hypotension chez le rat avec encéphalopathie hépatique due à la maladie de foie chronique: implication pour les complications neurologiques suivant la transplantation hépatique. Thèse de doctorat. Université de Montréal. 13-25.
- Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH, (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*, **332**, 1519 – 1523.
- Conso F, Hermouet C, (1993). Maladies hépatiques toxiques d'origine professionnelle. Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS 16-530-J-10
- Conti P, Reale M, Panara MR, Barbacane RC, Bongrazio M, Dempsey RA, (1991). Human recombinant interleukin-1 receptor antagonist inhibits lymphocyte blastogenesis induced by concanavalin A. Restorative effect of hrIL-1. *FEBS Lett*, **286**, 137 – 141.
- Cook NC, Samman S, (1996). Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem*, **7**, 66–76.
- Costa A, Garcia-Diaz DF, Jimenez P, Silva PI, (2013). Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries. *J Funct Food*, **5**, 539 – 549.
- Cuéllar MJ, Giner RM, Recio MC, Just MJ, Manez S, Cerda, S., Rios JL, (1998). Screening of antiinflammatory medicinal plants used in traditional medicine against skin diseases. *Phytother Res*, **12**, 18–23.
- Custodio JM, Wu CY, Benet LZ, (2008). Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv drug deliv rev*, **60**, 717 – 733.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman A, Szabo C, (1998). Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine. A combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite

- scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med*, **24**, 450 – 459.
- Da Silva JAT, (2004). Mining the essential oils of the *Anthemidea*. *Afr J Biotechnol*, **3**, 706-720.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R, (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, **329**, 23–38.
- Dasgupta A, Wahed A, (2014). Liver diseases and liver function tests IN Clinical chemistry, immunology and laboratory quality control: A comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice. Elsevier. pp 177-195.
- de Andrade Belo MA, Soares VE, de Souza LM, da Rosa Sobreira MF, Silveira Cassol DM, Toma SB, (2012). Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats. *Exp Toxicol Pathol*, **64**, 155–165.
- Debnath PC, Das A, Islam A, Islam MA, Hassan MM, Gias Uddin SM, (2013). Membrane stabilization, A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of a Bangladeshi medicinal plant: *Erioglossum rubiginosum* (Bara Harina). *Phcog J*, **5**, 104 – 107.
- Demirtaş I, Gecibesler IH, Yaglioglu AS, (2013). Antiproliferative activities of isolated flavone glycosides and fatty acids from *Stachys byzantina*. *Phytochem Lett*, **6**, 209–214.
- Derbesy M, Touche J, Zola A, (1989). The essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L. *J Essent Oil Res*, **1**, 269–275.
- Dhiman RK, Chawla YK, (2008). Minimal hepatic encephalopathy: time to recognise and treat, *Trop. Gastroenterol*, **29**, 6–12.
- Djeridane A, Yousfi M, Brunel JM, Stocker P, (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *FoodChem Toxicol*, **48**, 2599-2606.
- Domiciano TP, Dalalio MMO, Silva EL, Ritter AMV, Estevão-Silva CM, Cuman RKN, Bersani-Amado CA, (2013). Inhibitory effect of anethol in nonimmune acute inflammation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **386**, 331–338.
- Dooley JS, Lok ASF, Burroughs AK, Heathcote EJ, (2011). Sherlock's diseases of the liver and biliary system, 12<sup>ème</sup> édition, Blackwell science, John Wiley & Sons, Ltd, Milan, Italy. pp 1-254.
- Dusek P, Schneider SA, Aaseth J, (2016). Iron chelation in the treatment of neurodegenerative diseases. *J Trace Elem Med Biol*, **38**, 81–92.
- Ekataksin W, Kaneda K, (1999). Liver microvascular architecture: an insight into the pathophysiology of portal hypertension. *Semin Liver Diss*, **19**, 359 – 382.
- El-Badry AM, Moritz W, Contaldo C, Tian Y, Graf R, Clavien PA, (2007). Prevention of reperfusion injury and microcirculatory failure in macrosteatotic mouse liver by omega-3 fatty acids. *Hepatology*, **45**: 855 - 863.

- El-bakry K, Toson E, Serag M, Aboser M, (2016). Hepatoprotective effect of *moringa oleifera* leaves extract against carbon tetrachloride- induced liver damage in rats. *World J Pharm Pharm Sci*, **5**, 76 – 89.
- EL-Sahhar KL, Nassar DM, Farag HM, (2011). Morphological and anatomical Studies of *Santolina chamaecyparissus* L. (Asteraceae) Li anatomical characetrisant volatile oil. *Res J Agric Biol Sci*, **7**, 413 – 422.
- Elsharkawy ER, (2014). Anticancer effect and seasonal variation in oil constituents of *Santolina chamaecyparissus*. *Chem Materials Res*, **6**, 85 – 91.
- Emen S, Çeken B, Kızıl G, Kızıl M, (2009). DNA damage protecting activity and *in vitro* antioxidant potential of the methanol extract of *Cyclotrichium niveum*. *Pharm Biol*, **47**, 219–229.
- Enomoto K, Nishikawa Y, Omori Y, Tokairin T, Yoshida M, Ohi N, Nishimura T, Yamamoto Y, Li Q, (2004). Cell biology and pathology of liver sinusoidal endothelial cells. *Med. Electron Microsc*, **37**, 208–215..
- Farida T, Salawu OA, Tijani AY, Ejiofor JI, (2012). Pharmacological evaluation of *Ipomoea asarifolia* (Desr.) against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *J Ethnopharmacol*, **142**, 642 – 646.
- Fedel-Miyasato LES, Kassuya CAL, Auharek SA, Formagio ASN, Cardoso CAL, Mauro MO, Cunha-Laura AL, Monreal ACD, Vieira MC, Oliveira RJ, (2014). Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. *Rev Bras Farmacogn*, **24**, 565 – 575.
- Ferrari B, Tomi F, Casanova J, (2005). Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol*, **33**, 445 – 449.
- Fiedman LS, Keefe EB.(2004). Handbook of liver diseases. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; pp.1-16.
- Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J, (2003). Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol*, **65**, 261 – 311.
- Francisco V, Costa G, Figueirinha A, Marques C, Pereira P, Neves BM, (2013). Antiinflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- $\kappa$ B pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. *J Ethnopharmacol*, **148**, 126 – 134.
- Friedman SL, (2008). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterol*, **134**, 1655 – 1669.
- Fromenty B, Lettéron P, Pessayre D, (2003). Aspects physiopathologiques. *La lettre de l'hépatogastroentérologie*, **6**, 12 – 17.
- Fromont C. (2001). Particularites de la pathologie hepatiche chez le chat. Doctorat veterinaire la faculte de medecine de creteil. Ecole nationale veterinaire d'alfort.
- Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, Mashino T, Kasahara T, (2011). Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *Int Immunopharmacol*, **11**, 1150–1159.

- Gao X, Bjork L, Trajkovski V, Ugglá M, (2000). Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *J Sci Food Agric*, **80**, 2021 – 2027.
- Garry GG, Kieran S, (2005). Mechanism of Action of Paracetamol. *Am J Ther*, **12**, 46 – 55.
- Ghissi Z, Sayari N, Kallel R, Bougatef A, Sahnoun Z, (2016). Antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and wound healing effects of *Artemisia campestris* aqueous extract in rat. *Biomed Pharmacoth*, **84**, 115–122.
- Giner Pons RM, Rios Canavate JL, (2000). *Santolina chamaecyparissus*: Especie mediterranea con potenciales aplicaciones terapeuticas en procesos inflamatorios y transtornos digestivos. *Revista de Fitoterapia*, **1**, 27 – 34.
- Giner RM, Rios JL, Villar A, (1988). CNS depressant effects, anti-inflammatory activity and anti- cholinergic actions of *Santolina chamaecyparissus* extracts. *Phytother Res*, **12**, 37 – 41.
- Giner RM, Rios JL, Villar A, (1989). Inhibitory effects of *Santolina chamaecyparissus* extracts against spasmogen agonists. *J Ethnopharmacol*, **27**, 1-6.
- Girish C, Pradhan SC. (2012). Hepatoprotective activities of picroliv, curcumin, and ellagic acid compared to silymarin on carbontetrachloride-induced liver toxicity in mice. *J Pharmacol Pharmacother*, **3**, 149 – 155.
- Glaser SS, Gaudio E, Miller T, Alvaro D, Alpini G, (2009). Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert Rev Mol Med*, **11**, 1 – 20.
- Gnanadesigan M, Ravikumar S, Anand M, (2016). Hepatoprotective activity of *Ceriops decandra* (Griff.) Ding Hou mangrove plant against CCl<sub>4</sub> induced liver damage. *J Taibah Univ Sci*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusc.2016.07.004>
- Goel A, Dani V, Dhawan DK, (2005). Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos induced toxicity. *Chem Biol Interact*, **156**, 131 – 140.
- Gonzalez R, Ballester I, López-Posadas R, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, Sanchez de Medina F, (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **51**, 331 – 362.
- Grosso C, Cristina A, Burillo FJ, Mainar AM, Urieta JS, Barroso JG, Coelho JA, Palavra AMF, (2009). Supercritical fluid extraction of the volatile oil from *Santolina chamaecyparissus*. *J Sep Sci*, **32**, 3215 – 3222.
- Guha G, Rajkumar V, Kumar RA, Mathew L, (2011). The antioxidant and DNA protection potential of Indian tribal medicinal plants. *Turk J Biol*, **35**, 233–242.
- Gujrati V, Patel N, Rao VN, (2007). Hepatoprotective activity of alcoholic and aqueous extracts of leaves of *Tylophora indica* (L) in rats. *Indian J Pharmacol*, **39**, 43 – 47.
- Gülçin I, Elmastat M, Aboul-Enein HY, (2007). Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytother Res*, **21**, 354 – 361.

- Gülçin I, Huyut Z, Elmastas M, Aboul-Enein HY, (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab J Chem*, **3**, 43 – 53.
- Gupta RK, Hussain T, Panigrahi G, Das A, Singh GN, Sweetey K, Faiyazuddin M, Rao CV, (2011). Hepatoprotective effect of *Solanum xanthocarpum* fruit extract against CCl<sub>4</sub> induced acute liver toxicity in experimental animals. *Asian Pac J Trop Med*, **4**, 964 – 968.
- Hafez MM, Al-Harbi NO, Al-Hoshani AR, Al-hosaini KA, Al-Shrari SD, Al-Rejaie SS, MM Sayed-Ahmed & Al-Shabanah OA, (2015). Hepatoprotective effect of rutin via IL-6/STAT3 pathway in CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. *Biol Res*, **48**, 30 – 39.
- Halliwell B, (2001). Role of free radicals in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drug Aging*, **18**, 685–716.
- Hawkins RA, Jessy J, Mans AM, Chedid A, DeJoseph MR, (1994). Neomycin reduces the intestinal production of ammonia from glutamine. *Adv Exp Med Biol*, **368**, 125–134.
- Hena, Tiwari P, Srivastava M, Ghoshal S, (2016). Hepatoprotective and histopathological Activity of Ethanol and Aqueous extracts of stem of *Aloe vera* Linn (Ghee gangwar) against paracetamol-induced liver damage in rats. *Int J Pharm Biol Sci*, **1**, 1 – 7.
- Henry G, Garner WL, (2003). Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin North Am*, **83**, 483–487.
- Higuchi H, Gores GJ, (2003). Mechanisms of liver injury: an overview. *Curr Mol Med*, **3**, 483–490.
- Hinson JA, Roberts DW & James LP, (2010). Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol*, **196**, 369 – 405.
- Hofmann AF, (2009). Bile acids - trying to understand their chemistry and biology with the hope of helping patients. *Hepatology*, **49**, 1403 – 1418 .
- Höhn A, König J, Grune T, (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J Proteomics*, **92**, 132 – 159.
- <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt#null>
- [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=41644&lvl=3&p=has\\_linkout&keep=1&srchmode=1&unlock](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=41644&lvl=3&p=has_linkout&keep=1&srchmode=1&unlock)
- Hua L, Xiaoyu W, Peihong L, Yong L, Hua W, (2008). Comparative study of antioxidant activity of grape (*vitis vinifera*) seed powder assessed by different methods. *J Food Drug Anal*, **16**, 67 – 73.
- Hurkadale PJ, Shelar PA, Palled SG, Mandavkar YD, Khedkar AS, (2012). Hepatoprotective activity of *Amorphophallus paeoniifolius* tubers against paracetamol-induced liver damage in rats. *Asian Pac J Trop Biomed*, **2**, S238 – S242.
- Hwang H, Kim YW, Park Y, Hwang SJ, Kim YW, Park Y, Lee HJ, Kim KW, (2014). Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells. *Inflamm Res*, **63**, 81–90.

- Ibrahim M, Khaja ZU, Narasu ML, (2011). Hepatoprotective activity of *Boswellia serrata* extracts: *in vitro* and *in vivo* studies. *Int J Pharm Applications*, **2**, 89 – 98.
- Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, Flavell RA, Mehal WZ, (2009). Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr 9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest*, **119**, 305 – 314.
- Inouye S, Uchida K, Abe S, (2006). Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. *J Infect Chemother*, **12**, 210 – 216.
- Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A, (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*, **44**, 88 – 106.
- Jayakumar T, Ramesh E, Geraldine P, (2006). Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol*, **44**, 1989 – 1996.
- Jepsen P, Ott P, Andersen PK, Sørensen HT, Vilstrup H, (2010). Clinical course of alcoholic liver cirrhosis: a Danish population-based cohort study. *Hepatology*, **51**, 1675–1682.
- Jiang J, Briedé JJ, Jennen DGJ, Summeren AV, Saritas-Brauers K, Schaart G, Kleinjans JCS, de Kok TMCM (2015). Increased mitochondrial ROS formation by acetaminophen in human hepatic cells is associated with gene expression changes suggesting disruption of the mitochondrial electron transport chain. *Toxicol Lett*, **234**, 139 – 150.
- Kale I, Khan MA, Irfan Y & Goud V, (2012). Hepatoprotective potential of ethanolic and aqueous extract of flowers of *Sesbania grandiflora* (Linn) induced by CCl<sub>4</sub>. *Asian Pac J Trop Biomed*, **2**, S670 – S679.
- Kalita S, Kumar G, Karthik L, Rao KBV, (2012). *in vitro* antioxidant and DNA damage inhibition activity of aqueous extract of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) leaves. *Asian Pac J Trop Biomed*, **2**, S1675–S1679.
- Kamisako T, Kobayashi Y, Takeuchi K, Ishihara T, Higuchi K, Tanaka Y, Gabazza EC, Adachi Y, (2000). Recent advances in bilirubin metabolism research: the molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance. *J Gastroenterol*, **35**, 659–664.
- Kamisan FH, Yahya F, Ismail NA, Din SS, Mamat SS, Zabidi Z, Zainulddin WNW, Mohtarrudin N, Husain H, Ahmad Z, Zakaria ZA, (2013). Hepatoprotective Activity of Methanol Extract of *Melastoma malabathricum* Leaf in Rats. *J Acupunct Meridian Stud*, **6**, 52 – 55.
- Khan RS, Houlihan DD, Newsome PN, (2015). Investigation of jaundice Assessment of liver disease. *Medicine*, **43**, 573 – 576.
- Kierszenbaum AL, (2002). Histologie et biologie cellulaire. Une introduction à l'anatomie pathologique. Deboeck. 1 edition Bruxelles. pp 471.
- Kim H, Zamel R, Bai XH, Liu M, (2013). PKC activation induces inflammatory response and cell death in human bronchial epithelial cells. *PLoS One*, **8**e64182. doi:10.1371/journal.pone.0064182.

- Kim KA, Lee WK, Kim JK, Seo MS, Lim Y, Lee KH, Chae G, Lee SH, Chung Y, (2001). Mechanism of refractory ceramic bre- and rock wool induced cytotoxicity in alveolar macrophages. *Int Arch Occup Environ Health*, **74**, 9–15.
- Kızıl G., Kızıl M., Çeken B., Yavuz M., Demir H (2011). Protective ability of ethanol extracts of *hypericum scabrum*L. and *hypericum retusum* aucher against the protein oxidation and DNA damage. *Int J Food Prop*, **14**, 926–940.
- Kmiec Z, (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, **161**, 1 – 151.
- Knapp-Pogozelski W, Tullius TD, (1998). Oxidative strand scission of nucleic acids: routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety. *Chem Rev*, **98**, 1089 – 1107.
- Knolle PA, Gerken G, (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*, **174**, 21–34.
- Knolle PA, Limmer A, (2003). Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med. Weekly*, **133**, 501–506.
- Kodali S, McGuire BM, (2015). Diagnosis and management of hepatic encephalopathy in fulminant hepatic failure. *Clin Liver Dis*, **19**, 565 – 576.
- Kondo T, Ishida Y,(2010). Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int*, **203**, 93–98.
- Kumarappan C, Jaswanth A, Kumarasunderi K, (2011). Antihaemolytic and snake venom neutralizing effect of some Indian medicinal plants. *Asian Pac J Trop Med*, **4**, 743 – 747.
- Kumawat R, Sharma S, Vasudeva N, Kumar S, (2012). *in vivo* antiinflammatory potential of various extracts of *Sida tiagii* Bhandari. *Asian Pac J Trop Biomed*, **2**, S947 – S952.
- Lanthier N, Horsmans Y, Leclercq IA, (2009). The metabolic syndrome: how it may influence hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **12**, 404 – 411.
- Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW, (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, **2**, 787–795.
- Le K, Chiu F, Ng K, (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chem*, **105**, 353 – 363.
- LeCluyse EL, Witek RP, Andersen ME, Powers MJ, (2012). Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol*, **42**, 501 – 548.
- Lemańska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zielinski R, Soffers AEMF, Rietjens MCM, (2001). The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radic Biol Med*, **31**, 869–881.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y, (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem*, **102**, 771 – 776.
- Lima ALA, Alves AF, Xavier AL, Mozzini-Monteiro T, Oliveira TRR, Leite FC, Matias WN, Branco MVSC, Souza MFV, Piuvezam MR, (2016). Anti-inflammatory activity and acute

- toxicity studies of hydroalcoholic extract of *Herissantia tiubae*. *Rev Bras Farmacogn*, **26**, 225–232.
- Lin HM, Tseng HC, Wang CJ, Lin JJ, Lo CW, Chou FP, (2008). Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn extract against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats. *Chem Biol Interact*, **171**, 283– 293.
- Liu H, Qiu N, Ding H, Yao R, (2008). Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Res Int*, **41**, 363–370.
- Liz R, Pereira DF, Horst H, Dalmarco EM, Dalmarco JB, Simionatto EL, Pizzolatti MG, Girard D, Fröde TS, (2011). Protected effect of *Esenbeckia leiocarpa* upon the inflammatory response induced by carrageenan in a murine air pouch model. *Int Immunopharmacol*, **11**, 1991–1999.
- Ljubuncic P, Song H, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A, (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *J Ethnopharmacol*, **100**, 198 – 204.
- Lopez V, Akerreta S, Casanova E, Garca-Mina JM, Cavero RY, Calvo MI, (2008). Screening of Spanish medicinal plants for antioxidant and antifungal activities. *Pharm Biol*, **46**, 602 – 609.
- Louis H, Le Moine O, Peny MO, Quertinmont E, Fokan D, Goldman M, Devière J (1997). Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology*, **25**, 1382-1389.
- Louvet A, Boitard J, Dharancy S, Duriez A, Deltenre P, Paris JC, Mathurin P, (2006). La mésaventure thérapeutique du paracétamol chez le buveur excessif. *Gastroentérol Clin Biol*, **30**, 769 – 774.
- Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N, (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 09 juin: 35 – 40.
- Majhenic L, Kerget MS, Knez Z, (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chem*, **104**, 1258–1268.
- Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR, (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol*, **33**, 27 – 34.
- Mangua HM, Brkic D, Marie DEP, Quetin-Leclercq J, (2004). *in vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*, **92**, 209 – 214.
- Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA, (2007). Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, **25**, 185–209.
- Mansour S, Djebli N, Eroglu Ozkan E, Mat A, (2014). *in vivo* antiinflammatory activity and chemical composition of *Hypericum scabroides*. *Asian Pac J Trop Med*, **7**, S514 – S520.

- Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M, (2003). Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*, **37**, 917–23.
- Marieb EN, Hoehn K, (2015). Anatomie et physiologie humaines. 9ème édition. Pearson. pp 1023-1038.
- Marklund S, Marklund G, (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, **47**, 469 – 474.
- Maronpot RR, Yoshizawa K, Nyska A, Harada T, Flake G, Mueller G, Singh B, Ward JM, (2010). Hepatic enzyme induction: histopathology. *Toxicol Pathol*, **38**, 776-795.
- Marston A, Hostettmann K, (2006). Separation and quantification of flavonoids. pp. 1–36 IN Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications, eds. Andersen, Ø., Markham, K. R., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA. pp 1-37.
- Martin-Murphy BV, Holt MP, Ju C, (2010). The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen induced liver injury in mice. *Toxicol Lett*, **192**, 387 – 94.
- Mayakrishnan V, Veluswamy S, Sundaram KS, Kannappan P, Abdullah N, (2012). Free radical scavenging potential of *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl fruits extract. *Asian Pac J Trop Med*, **6**, 20 – 26.
- Mayuren C, Reddy VV, Priya SVP, Devi VA, (2010). Protective effect of Livactine against CCl<sub>4</sub> and paracetamol induced hepatotoxicity in adult Wistar rats. *North Am J Med Sci*, **2**, 491 – 495.
- Mazaleuskaya LL, Sangkuhl K, Thorn CF, Fitz Gerald GA, Altman RB, Klein TE, (2015). PharmGKB summary: pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. *Pharmacogenet Genomics*, **25**, 416 – 426.
- McGill MR, Sharpe MR, Williams CD, Taha M, Curry SC, Jaeschke H (2012). The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J Clin Invest*, **122**, 1574-1583.
- McGill MR, Jaeschke H, (2013). Oxidant stress, antioxidant defense, and liver injury IN: Drug-induced liver disease 3ème édition Elsevier 2013, pp 71 – 84.
- Meziti H, 2009. Evaluation de l'effet anti-inflammatoire et antioxydant des extraits de *Malva parviflora* L. Mémoire de magister. Université Sétif.
- Mihailovic V, Mihailovic M, Uskokovic A, Arambašic J, Mišic D, Stankovic V, Katanic J, Mladenovic M, Solujic S, Matic S, (2013). Hepatoprotective effects of *Gentiana asclepiadea* L. extracts against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol*, **52**, 83–90.
- Mihara M, Uchiyama M, (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, *Anal Biochem* **86**, 271–278.

- Mohajer S, Taha RM, Ramli RB, Mohajer M, (2016). Phytochemical constituents and radical scavenging properties of *Borago officinalis* and *Malva sylvestris*. *Ind Crops Prod*, **94**, 673–681.
- Mohamed Saleem TK, Azeem AK, Dilip C, Sankar C, Prasanth NV, Duraisami R, (2011). Anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Gendarussa vulgaris* Nees. *Asian Pac J Trop Biomed*, **1**, 147 – 149.
- Mohamed Saleem TS, Madhusudhana Chetty C, Ramkanth S, Rajan VST, Mahesh Kumar K, Gauthaman K, (2010). Hepatoprotective Herbs – A Review. *Int J Res Pharm Sci*, **1**, 1 – 5.
- Monfort AAF, (2016). Les médicaments responsables d'hépatotoxicité chez les animaux de compagnie. Thèse pour le doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. pp 26-27.
- Moore KL, Dalley AF, (2001). Anatomie médicale aspects fondamentaux et applications cliniques. 4<sup>ème</sup> édition. De Boeck. pp 267-277.
- Morgan ET, (2009). Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*, **85**, 434 – 438.
- Moura FA, Queiroz de Andrade K, Farias dos Santos JC, Pimentel Araujo OR, Fonseca Goulart MO, (2015). Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? *Redox Biol*, **6**, 617 – 639.
- Murlidhar A, Babu KS, Sankar TR, Redenna P, Reddy GV, Latha J, (2010). Anti-inflammatory activity of flavonoid fraction isolated from stem bark of *Butea monosperma* (Lam): a mechanism based study. *Int J Phytopharmacol*, **1**, 124 – 132.
- Naidu MM, Shyamala BN, Naik JP, Sulochanamma G, and Srinivas P, (2011). Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *Lebensm Wiss Technol*, **44**, 451 – 456.
- Nardo P, Purins & macérations: Toutes les préparations plante par plante, Rustica éditions 2011. pp 79.
- Natesan V, Mani R, Arumugam R, (2016). Review Clinical aspects of urea cycle dysfunction and altered brain energy metabolism on modulation of glutamate receptors and transporters in acute and chronic hyperammonemia. *Biomed Pharmacother*, **81**, 192–202.
- Nicolaou A, Pilkington SM, Rhodes LE, (2011). Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids. *ChemPhysLipids*, **164**, 535–543.
- Nkosi CZ, Opoku AR, Terblanche SE, (2005). Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate on the activity levels of certain plasma enzymes in CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in low protein fed rats. *Phytother Res*, **19**, 341–345.
- O'Grady JG, Schalm SW, (1993). Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet*, **342**, 273 – 276.
- Okoli CO, Akah PA, Nwafor SV, Anisiobi AI, Ibegbunam IN, Erojikwe O, (2007). Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* CD Adams. *J Ethnopharmacol*, **109**, 219–225.

- Olaleye MT, Akinmoladun AC, Ogunboye AA, Akindahunsi AA, (2010). Antioxidant activity and hepatoprotective property of leaf extracts of *Boerhaavia diffusa* Linn against acetaminophen-induced liver damage in rats. *Food Chem Toxicol*, **48**, 2200–2205.
- Ozen T, Demirtas I, Aksit H, (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chem*, **124**, 58 – 64.
- Pala-Paul J, Perez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A, Ramos-Vazquez P, Gomez-Contreras F, Sanz J, (1999). Essential oil of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*: first isolation of capillene, a diacetylene derivative. *FlavourFrag J*, **14**, 131 – 134.
- Palikova I, Valentova K, Oborna I, Ulrichova J. (2009). Protectivity of blue honeysuckle extract against oxidative human endothelial cells and rat hepatocyte damage. *J Agric Food Chem*, **57**, 6584–6589.
- Pandit A, Sachdeva T, Bafna P, (2012). Drug-induced hepatotoxicity: a review. *J Appl Pharm Sci*, **2**, 233–243.
- Park G, Kim KM, Choi S, Oh DS, (2016). *Aconitum carmichaelii* protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity via B-cell lymphoma-2 protein-mediated inhibition of mitochondrial dysfunction. *Environ Toxicol Pharmacol*, **42**, 218–225.
- Pastor CM, Suter PM, (1999). Hepatic hemodynamics and cell functions in human and experimental sepsis. *Anesth Analg*, **89**, 344 – 352.
- Patrick-Iwuanyanwu KC, Amadi U, Charles IA, Ayalogu EO, (2012). Evaluation of acute and sub-chronic oral toxicity study of baker cleansers bitters -a polyherbal drug on experimental rats. *EXCLI J*, **11**, 632 – 640.
- Podder B, Kim YS, Zerlin T, Song HY, (2012). Antioxidant effect of silymarin on paraquat-induced human lung adenocarcinoma A549 cell line. *Food Chem Toxicol*, **50**, 3206 – 3214.
- Pol S, (2009). ANRS HC 02 RIBAVIC: Impact de la stéatose au cours de la co-infection VHC-VIH, *Gastroenterol Clin Biol*, **33**, S110 – S112.
- Prasad KN, Xie H, Hao J, Yang B, Qiu S, Wei X, Chen F, Jiang Y, (2010). Antioxidant and anticancer activities of 8-hydroxypsoralen isolated from wampee [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] peel. *Food Chem*, **118**, 62-66.
- Prince Vijeya Singh J, Selvendiran K, Mumtaz Banu S, Padmavathi R, Sakthisekaran D, (2004). Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. *Phytomedicine*, **11**, 309–314.
- Que F, Mao L, Pan X, (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res Int*, **39**, 581 – 587.
- Rajagopal SK, Manickam P, Periyasamy V, Namasivayam N, (2003). Activity of *Cassia auriculata* leaf extract in rats with alcoholic liver injury. *J Nutr Biochem*, **14**, 252– 258.
- Reeves HL, Friedman SL, (2002). Activation of hepatic stellate cells – a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci*, **7**, d808–d826.

- Rithidech KN, Tungjai M, Reungpatthanaphong P, Honikel L, Simon SR, (2012). Attenuation of oxidative damage and inflammatory responses by apigenin given to mice after irradiation. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, **749**, 29 – 38.
- Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R, (2000). The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology*, **32**, 734 – 739.
- Royer M, Diouf PN, Stevanovic T, (2011). Polyphenol contents and radical scavenging capacities of red maple (*Acer rubrum* L.) extracts. *Food Chem Toxicol*, **49**, 2180 – 2188.
- Rudiuk S, (2009). Complexation entre l'ADN et des tensioactifs cationiques: études physico-chimiques et photobiologiques. Doctorat de l'université de toulouse.
- Saba AB, Oyagbemi AA, Azeez OI, (2010). Amelioration of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and haemotoxicity by aqueous leaf extract of *Cnidioscolus aconitifolius* in rats. *Niger J Physiol Sci*, **25**, 139 – 147.
- Sahreen S, Khan MR, Khan RA, (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem*, **122**, 1205 – 1211.
- Sahu SC, (2007). Hepatotoxicity. From Genomics to *in vitro* and *in vivo* Models. John Wiley & Sons Ltd, pp 191-635.
- Saija A, Scalse M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F, (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembrane. *Free Radic BiolMed*, **19**, 481 – 486.
- Sala A, Recio MC, Giner RM, Máñez S, Ríos JL, (2000). Anti-phospholipase A2 and anti-inflammatory activity of *Santolina chamaecyparissus*. *Life Sci*, **66**, PL35 – 40.
- Saleem M, Ahmed B, Karim M, Ahmed S, Ahmad M, Qadir MI, Syed NH, (2014). Hepatoprotective effect of aqueous methanolic extract of *Rumex dentatus* in paracetamol induced hepatotoxicity in mice. *Bangladesh J Pharmacol*, **9**, 284 – 289.
- Salem MM, Abd El- Rasheid HG, Mahmoud AN, (2015). Therapeutic effects of curcumin and royal jelly as natural antioxidants on some biochemical parameters in hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) in male albino rats. *Int J Adv Res*, **3**, 520 – 535.
- Salminen WF, Yang X, Shi Q, Greenhaw J, Davis K, Ali AA, (2012). Green tea extract can potentiate acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol*, **50**, 1439 – 1446.
- Samudram P, Vasuki R, Rajeshwari H, Geetha A, Sathiya Moorthi P, (2009). Antioxidant and antihepatotoxic activities of ethanolic crude extract of *Melia azedarach* and *Piper longum*. *J Med Plants Res*, **3**, 1078 – 1083.
- Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P, (2011). A Review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Int Pharma Sci*, **1**, 25 – 41.
- Sanz JF, Garcia-Sarrion A, Marco JA, (1991). Germacrane derivatives from *Santolina chamaecyparissus*. *Phytochemistry*, **30**, 3339 – 3342.

- Sarhadynejad Z, Sharififar F, Pardakhty A, Nematollahi MH, Sattaie-Mokhtari S, Mandegary A, (2016). Pharmacological safety evaluation of a traditional herbal medicine “Zereshk-e-Saghir” and assessment of its hepatoprotective effects on carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *J Ethnopharmacol*, **190**, 387–395.
- Sasidharan S, Aravindran S, Latha LY, Vijenthi R, Saravanan D, Amutha S, (2010). *in vitro* antioxidant activity and hepatoprotective effects of *lentinula edodes* against paracetamol induced hepatotoxicity. *Molecules*, **15**, 4478–4489.
- Sasikumar JM, Mathew GM, Teepica PDD, (2010). Comparative studies on antioxidant activity of methanol extract and flavonoid fraction of *Nyctanthes arbortristis* leaves. *Electron J Environ Agric Food Chem*, **9**, 227 – 233.
- Satoh H, Fukuda Y, Anderson DK, Ferrans VJ, Gillette JR, Pohl LR, (1985). Immunological studies on the mechanism of halothane-induced hepatotoxicity: immunohistochemical evidence of trifluoroacetylated hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **233**, 857– 862.
- Schmidt-Arras D, Rose-John S, (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy, *J Hepatol*, **64**, 1403–1415.
- Schuppan D, Afdhal NH, (2008). Liver Cirrhosis. *Lancet*, **371**, 838–851.
- Seidel V, (2005). Initial and Bulk Extraction. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 27-37.
- Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C, (2003). Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp Toxicol Pathol*, **54**, 313–318.
- Sendensky A, Dufour JF, (2011). Liver physiology In Chronic liver failure mechanisms and management. Humana press. pp 33-46.
- Shah VN, Deval K. (2011). Hepatoprotective activity of leaves of *Parkinsonia aculeata* linn against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *Int J Pharma*, **1**, 59 – 66.
- Shakya AK, Sharma N, Saxena M, Shrivastava S, Shukla S, (2012). Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective effect of Majoon-e-Dabeed-ul-ward against carbon tetrachloride induced liver injury. *Exp Toxicol Pathol*, **64**, 767–773.
- Shanmugam S, Thangaraj P, Lima BdS, Chandran R, de Souza Araújo AA, Narain N, Serafini MR, Quintans Júnior LJ, (2016). Effects of luteolin and quercetin 3-b-D-glucoside identified from *Passiflora subpeltata* leaves against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother*, **83**, 1278–1285.
- Shin HS, Satsu H, Bae MJ, Shimizu M, (2015). Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chem*, **168**, 167 – 175.
- Singh D, Arya PV, Sharma A, Dobhal MP, Gupta RSJ, (2015). Modulatory potential of  $\alpha$ -amyrin against hepatic oxidative stress through antioxidant status in wistar albino rats. *Ethnopharmacol*, **161**, 186 – 193.

- Smedsrød B, Le Couteur D, Ikejima K, Jaeschke H, Kawada N, Naito M, Knolle P, Nagy L, Senoo H, Vidal-Vanaclocha F, Yamaguchi N, (2009). Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium. *Liver Int*, **29**, 490 – 499.
- Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM, (2004). Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem*, **11**, 1135 – 1146.
- Sowndhararajan K, Kang SC, (2013). Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. *Saudi J Biol Sci*, **20**, 319–325.
- Stadtman ER, (2006). Protein oxidation and aging. *Free Radic Res*, **40**, 1250–1258.
- Stalikas CD, (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids, *J Sep Sci*, **30**, 3268 – 3295.
- Stanojević L, Stanković M, Nikolić V, Nikolić L, Ristić D, Čanadanovic-Brunet J, Tumbas V, (2009). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. Extracts. *Sensors*, **9**, 5702 – 5714.
- Su JJ, Wang XQ, Song WJ, Bai XL, Li CW, (2016). Reducing oxidative stress and hepatoprotective effect of the water extracts from Pu-erh tea on rats fed with high-fat diet. *Food Sci Human Wellness*, **5**, 199–206.
- Subramanian M, Balakrishnan S, Chinnaiyan SK, Sekar VK, Chandu AN, (2013). Hepatoprotective effect of leaves of *Morinda tinctoria* Roxb. against paracetamol induced liver damage in rats. *Drug invent today*, **5**, 223 – 228.
- Sung KC, Kim SH, (2011). Inter-relationship between fatty liver and insulin resistance in the development of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, **96**, 1093– 1097.
- Suresh B, Srirama S, Dhanaraja SA, Elango K, Chinnaswamy K, (1997). Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *J Ethnopharmacol*, **55**, 151 – 159.
- Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Constantini P, Ferri K F, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G, (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*, **192**, 571 – 580.
- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J, Dommes J, (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem*, **113**, 1226 – 1233.
- Talbi H, Boumaza A, El-mostafa K, Talbi J, Hilali A, (2015). Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Mater Environ Sci*, **6**, 1111 – 1117.
- Tan JBL, Lim YY, (2015). Critical analysis of current methods for assessing the *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food Chem*, **172**, 814–822.
- Taub R, Bansal M, Lei W, (2003). Roles of cytokines and growth factors in liver regeneration, repair and fibrosis after liver injury, IN : Drug-Induced Liver Disease, 1st Edition, N. Kaplowitz and L.D. DeLeve (Eds), Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp. 213–225.

- Tiwari P, Ahirwae D, Chandy A, Ahirwar B, (2014). Evaluation of hepatoprotective activity of alcoholic and aqueous extracts of *Selaginella lepidophylla*. *Asian Pac J Trop Dis*, **4**, S81–S86.
- Upadhyay G, Tiwari MN, Prakash O, Jyoti A, Shanker R, Singh MP, (2010). Involvement of multiple molecular events in pyrogallol-induced hepatotoxicity and silymarin-mediated protection: evidence from gene expression profiles. *Food Chem Toxicol*, **48**, 1660–1670.
- Van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandennebeele P, (2001). Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ*, **8**, 1136–1142.
- Vaquero J, Chung C, Cahill ME, Blei AT, (2003). Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Semin Liver Dis*, **23**, 259–269.
- Verma K, Shrivastava D, Kumar G, (2015). Antioxidant activity and DNA damage inhibition in vitro by a methanolic extract of *Carissa carandas* (Apocynaceae) leaves. *J Taibah Univ Sci*, **9**, 34–40.
- Voet D, Voet JG, (2005). Biochimie, 2ème édition. de boeck, traduction de la 3ème édition américaine par Rousseau et Domenjoud. pp 547-1069.
- Vukics V, Kery A, Bonn GK, Guttman A, (2008). Analysis of heartsease (*Viola tricolor* L.) flavonoid glycosides by micro-liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, **1206**, 11 – 20.
- Wang DW, Yin YM, Yao YM, (2013). Advances in the management of acute liver failure. *World J Gastroenterol*, **19**, 7069 – 7077.
- Ward FM, Daly MJ, (1999). Hepatic disease. In: Clinical pharmacy and therapeutics (Walker R, Edwards C. (eds.). New York, Churchill Livingstone, pp 195 – 212.
- Watanabe T, Misawa S, Hiradate S, Osaki M, (2008). Characterization of root mucilage from *Melastomamalabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *New Phytologist*, **178**, 581 – 589.
- Weber LW, Boll M, Stampfl A, (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*, **33**, 105–136.
- Wolkoff AW, Cohen DE, (2003). Bile acid regulation of hepatic physiology: I. Hepatocyte transport of bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **284**, G175 – 179.
- Wu C, Chen F, Wang X, Kim H, He G, Haley-Zitlin V, Huang G, (2006). Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. *Food Chem*, **96**, 220 – 227.
- Wu D, Bao C, Li L, Fu M, Wang D, Xie J, Gong X, (2015). Chlorogenic acid protects against cholestatic liver injury in rats. *J Pharmacol Sci*, **129**, 177 – 182.
- Yamaguchi F, Ariga T, Yoshimira Y, Nakazawa H, (2000). Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J Agric Food Chem*, **48**, 180 – 185.

- Yang K, Kock K, Sedykh A, Tropsha A, Brouwer KLR, (2013). An updated review on drug-induced cholestasis: mechanisms and investigation of physicochemical properties and pharmacokinetic parameters. *J Pharm Sci*, **102**, 3037 – 3057.
- Yerian L, (2012). Histopathological evaluation of fatty and alcoholic liver diseases. *J Dig Dis*, **12**, 17 – 24.
- Zdarilova A, Svobodova AR, Chytilova K, Simanek V, Ulrichova J, (2010). Polyphenolic fraction of *Lonicera caerulea* L. fruits reduced oxidative stress and inflammatory markers induced by lipopolysaccharide in gingival fibroblasts. *Food Chem Toxicol*, **48**, 1555 – 1561.
- Zhan SS, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, Torok NJ, (2006). Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis *in vivo*. *Hepatology*, **43**, 435 – 443.
- Zhang BB, Zhao K, He WQ, Wang D, Zang D, Chen K, Wang G, Gao F, (2011). Study on optimal condition of MTT in PBMC transformation. *Progress Vet Med*, **3**, 65 – 68.
- Zhao HX, Zhang HS, Yang SF, (2014). Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. *Food Sci Human Wellness*, **3**, 183 – 190.
- Zhao S, Zhao X, Su H, Liu X, Suo X, (2010). Development of MTT assay for the detection of peripheral blood T cell proliferation of swine. *Chin Anim Husbandry Vet Med*, **37**, 35–38.
- Zhong Y, Chiou YS, Pan MH, Shahidi F, (2012). Anti-inflammatory activity of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives in LPS-stimulated murine macrophages. *Food Chem*, **134**, 742 – 748.
- Zimmerman H, (1999). Drug Hepatotoxicity. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott; 1999.
- Zollner G, Trauner M, (2006). Molecular mechanisms of cholestasis. *Wien Med Wochenschr*, **156**, 380 – 385.

## ملخص

تم في هذه الدراسة، تقييم الفعل الوقائي للكبد للمستخلصين الإيثانولي والمائي لنباتة *Santolina chamaecyparissus* عند الجرذان المسممة بالباراسيتامول و رباعي كلوريد الكربون  $CCl_4$ . بينت النتائج أن هذين المركبين يحفظان السمية بشكل ملحوظ، غير أن الم عاملة الوقائية بالمستخلصين يقي الكبد من مخاطر السمية. فعند التركيز 150 مغ/كلغ يخفض كل من المستخلصان الإيثانولي أو المائي بصورة معتبرة احصائيا نشاط انزيم ALT بنسبة 58% و 80.5%، AST 70.5% و 66%، MDA 49.6% و 46.6%، LDH 76.7% و 69.2%، و يحافظان على نشاط انزيم SOD بـ 68.8% و 88.9% و ذلك في كل من نموذجي  $CCl_4$  و الباراسيتامول على الترتيب. كما بينت الدراسة النسيجية أن كلا المستخلصين يقيان ضد النخر الكبدي و التشحم. وكان هذا الفعل الوقائي متشابها مع ذلك المتحصل عليه بـ 100 مغ/كلغ من السيليمارين المستعمل كمرجع. كما بينت النتائج أن المستخلصين يملكان نشاطا مضادا للأكسدة جيد، حيث تبين أن لهما القدرة على التقاط جذور DPPH، ارجاع و استخلاص أيونات الحديد و ذلك بـ  $IC_{50}$  مساوية لـ 38 ميكروغرام/مل، 270 ميكروغرام/مل و 53 ميكروغرام/مل. إضافة إلى ذلك فإنهما يقيان كل من  $\beta$ -carotène، ADN و البروتين من الأكسدة بـ 77%، 52 - 93% و 59-92% على الترتيب. تم أيضا تقييم الفعل المضاد للإلتهاب لكلا المستخلصين حيويا و في الزجاج. و بينت النتائج أن كلا المستخلصين يثبطان بنسبة 36% وذمة الأذن المحفزة بزيت كروتون و يثبطان هجرة الخلايا البيضاء بـ 39%. كما أن معالجة الخلايا وحيدات النوى بـ 1 و 10 ميكروغرام/مل بالمستخلص المائي أو الإيثانولي خفضت من تركيز  $IL-1\beta$ ،  $TNF\alpha$  و  $IL-8$  بـ 60%، 16% و 43% على التوالي. في حين أن  $IL-10$  لم تتأثر. علاوة على ذلك أظهر المستخلصان عند التركيز 1 مغ/مل فعلا وقائيا ضد تحلل أغشية كريات الدم الحمراء. يمكن إرجاع الفعل الوقائي للكبد لكلا المستخلصين إلى نشاطهما المضاد للأكسدة و الإلتهاب اللذان يعودان إلى محتواهما من المركبات النشطة حيويا. و بالفعل بينت التحاليل الكيميائية أن كلا المستخلصين غنيين بالفلافونويدات و عديدات الفينول. يمكن إستغلال نبته *Santolina chamaecyparissus* كمصدر غني بالمركبات النشطة حيويا لاكتشاف أدوية جديدة طبيعية لعلاج الإصابات الكبدية.

**الكلمات الدالة:** حماية الكبد، مضاد الأكسدة، مضاد الإلتهاب، *Santolina chamaecyparissus*، عديدات الفينول، الفلافونويدات، الباراسيتامول، رباعي كلوريد الكربون

## Résumé

Dans la présente étude, l'effet hépatoprotecteur des extraits éthanolique (EE) et aqueux (EA) de *Santolina chamaecyparissus* est évalué chez les rats intoxiqués par le paracétamol et le  $CCl_4$ . Les résultats montrent que ces agents induisent une hépatotoxicité remarquable. Cependant, le traitement par l'EE ou l'EA, avant l'induction de l'hépatotoxicité, protège le foie. A 150 mg/Kg, l'EE ou l'EA diminuent significativement le taux d'ALT de 58% et 80.5%, d'AST de 70.5% et 66%, de MDA de 49.6% et 46.6%, de LDH de 76.7% et 69.2%, comme ils rétablissent l'activité de la SOD de 68.8% et 88.9% dans le modèle de  $CCl_4$  et de paracétamol respectivement. L'examen histologique a révélé que les deux extraits protègent le foie contre la nécrose et la stéatose. L'effet hépatoprotecteur des deux extraits était proche de celui du silymarin 100 mg/Kg, utilisé comme référence. D'autre part, les résultats montrent que les deux extraits sont doués d'activité anti-oxydante très importante. En effet, ces extraits scavengent les radicaux de DPPH, réduisent et chélatent le fer ferreux avec des  $IC_{50}$  de 38  $\mu$ g/ml, 270  $\mu$ g/ml et 53  $\mu$ g/ml respectivement. En plus, ils réduisent le blanchissement de la  $\beta$ -carotène avec 77%, l'oxydation de l'ADN avec 52% - 93% et l'oxydation de protéine avec 59% - 92%. L'activité anti-inflammatoire d'EA et d'EE est également évaluée *in vivo* et *in vitro*. Les résultats montrent que les deux extraits sont capables de réduire l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton avec 36% et inhibent la migration des leucocytes avec 39%. Le prétraitement des leucocytes mononucléaires avec 1 et 10  $\mu$ g/ml d'EA ou d'EE diminue le taux d' $IL-1\beta$ , de  $TNF\alpha$  et d' $IL-8$  par 60%, 16% et 43% respectivement, tandis que le taux de l' $IL-10$  n'est pas altéré. En outre, à 1 mg/ml, les deux extraits protègent les hématies contre l'hémolyse avec 55%. Globalement, l'effet hépatoprotecteur de ces extraits pourrait être attribué à leurs activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires exercées par leurs composés bioactifs. En effet, l'analyse phytochimique a révélé que ces extraits sont riches en polyphénols et en flavonoïdes. Ainsi, la plante *Santolina chamaecyparissus* pourrait être exploitée comme une source potentielle de composés bioactifs pour développer de nouveaux médicaments naturels pour traiter certains désordres hépatiques.

**Mots clés :** hépatoprotection, anti-oxydant, anti-inflammatoire, *Santolina chamaecyparissus*, polyphénols, flavonoïdes, paracétamol, tétrachlorure de carbone.