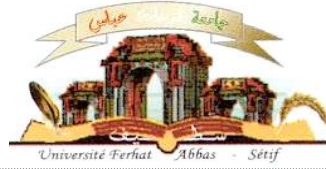


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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/2020

THÈSE

Présentée par

BENSLAMA Abderrahim

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Etude phytochimique et activités antioxydante et
hépatoprotectrice des extraits de *Thymus pallidus***

Soutenue publiquement le 29/12/2020

DEVANT LE JURY

Président	ARRAR Lekhmici	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	BOUMERFEG Sabah	Pr. Univ. BBA
Co-directeur	BAGHIANI Abderrahmane	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs	ZERARGUI Fatima	MCA. UFA Sétif 1
	MOSBAH Asma	MCA. Univ. Constantine 1
	MAAMERI Zineb	MCA. Univ. Constantine 1

Laboratoire de Biochimie Appliquée

Remerciements

Avant toutes choses, je remercie Allah, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force, volonté, la santé et la patience pour réaliser et finaliser ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Pr. Sabah BOUMERFEG, qui a tout d'abord acceptée la conduite et la direction de ma thèse, pour ses conseils pertinents, ses orientations et ses encouragements m'ont permis de mener à terminer ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement Pr. Abderrahmane BAGHIANI, mon co-encadreur, pour sa disponibilité tout au long de ce travail, pour mon avoir guidées dans ce travail, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses conseils judicieux.

J'adresse mes sincères remerciements à Pr. Lekhmici ARRAR, Professeur à l'Université Ferhat Abbas- Sétif 1, pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.

Je voudrais également remercier tous les membres du jury: Dr. Fatima ZERARGUI, Maitre de conférences à l'Université de Ferhat-Abbas Sétif 1, Dr. Asma MOSBAH, Maitre de conférences à l'Université de Constantine 1 et Dr. Zineb MAAMERI, Maitre de de conférences à l'Université de Constantine, qu'ils m'a honoré en acceptant de juger et d'évaluer ce travail.

ملخص

نبات *Thymus pallidus* الذي ينتمي إلى عائلة Lamiaceae والمسمى محليًا "الخيطة"، هو نبات طبي يستخدم على نطاق واسع في الغذاء والطب الشعبي الجزائري. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الأنشطة المضادة للأوكسدة والنشاط الواقي للكبد، وكذلك التأثير السام للمستخلصات النباتية. أدى استخلاص البوليفينول من الجزء الهوائي من النبات إلى الحصول على المستخلص الخام (E.Br) الذي تمت بواسطة مزيبات متزايدة القطبية إلى مستخلص الكلوروفورم (E.Ch)، مستخلص الإيثيل أسيتات (E.EtA) والمستخلص المائي (E.Aq). تم تقدير المحتوى الكلي من الفينولات والفلافونيدات بطرق القياس الطيفية. أظهرت النتائج أن E.EtA يحتوي على أكبر كمية من الفينولات والفلافونويدات بمعدل 1.91 ± 495.12 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك (GAE)/مغ مستخلص و 2.84 ± 97.25 ميكروغرام مكافئ كيرسيتين (QE)/مغ مستخلص، على التوالي. تم التحليل الكيميائي لكل من E.Br و E.EtA و E.Aq بواسطة تقنية HPLC-DAD-MS/MS. تم تحديد حوالي 49 مركبًا، حيث تشمل المركبات الفينولية الموجودة في المستخلصات على أحماض هيدروكسي بينزويك وحمض الهيدروكسيسيناميك ومشتقاته والفلافونويدات. كانت المركبات الفينولية الرئيسية هي حمض روزمارنيك، حمض السلفيانول والليوتولين. تم تحديد نشاط المستخلصات المضاد للأوكسدة *in vitro* من خلال عدة اختبارات. أظهر اختبار DPPH أن E.EtA يملك أعلى تأثير كاسح للجذور الحرة، كما أظهر نفس المستخلص أيضًا نشاطًا محليًا قويًا (53.38 ميكروغرام EDTA/مغ مستخلص)، نشاط إرجاعيا فعالا (929.73 ميكروغرام من حمض الأسكوربيك/مغ مستخلص) ونشاط قوي ضد الانحلال الدموي ($HT_{50}=109.44$ دقيقة). أثناء دراسة السمية فوق الحادة، لم تؤدي معالجة الفئران بـ E.Br و E.EtA بجرعات 50، 200، 500، 1000 و 2000 مغ/كغ من وزن الجسم/يوم لمدة 21 يوم إلى ظهور أي علامات واضحة للسمية في الفئران، حيث كانت DL_{50} أكبر من 2000 مغ/كغ. من ناحية أخرى، أظهر تقييم نشاط المستخلصات المضادة للأوكسدة *in vivo* أن معالجة الفئران *Swiss albinos* بـ E.Br و E.EtA بجرعة 500 مغ/كغ من وزن الجسم/يوم لمدة 21 يرفع من مستوى GSH ويخفض من مستوى MDA في الكبد والدماغ. بالإضافة إلى ذلك، زيادة في نشاط إنزيم CAT في الكلى. أظهرت دراسة التأثير الوقائي لـ E.Br ضد السمية الكبدية الناتجة عن CCl_4 في الفئران، أن المعالجة اليومية لهذه الأخيرة بجرعات 100، 250 و 500 مغ/كغ لمدة ستة أيام يخفض بشكل ملحوظ من نشاط إنزيمات ALT، AST و ALP و يقلل من مستويات MDA و يرفع من مستوى GSH. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من هذه الدراسة أن E.Br و E.EtA لنبات *Thymus pallidus* يملكان نشاطا قويا مضاد للأوكسدة *in vitro* و *in vivo*، كما أن التأثير الوقائي الكبدي لـ E.Br كان واضحا. بالإضافة إلى ذلك، مستخلصات *Thymus pallidus* ليست سامة بجرعة ≤ 2000 مغ/كغ، مما يشير بوضوح إلى الفوائد الصحية المحتملة للنبات في المستحضرات الغذائية والصيدلانية.

الكلمات المفتاح: *Thymus pallidus*، عديدات الفينول، النشاطية المضادة للأوكسدة، السمية فوق الحادة،

التأثير الوقائي الكبدي، HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

Résumé

Thymus pallidus de la famille des Lamiaceae appelé localement « Khyata », est une plante médicinale largement utilisée à des fins alimentaires et en médecine traditionnelle en Algérie. La présente étude vise à évaluer l'activité antioxydante, et hépatoprotectrice, ainsi que l'effet toxique des extraits de la plante *Thymus pallidus* et leur caractérisation phytochimique. L'extraction des polyphénols de la partie aérienne de la plante étudiée suivie d'un fractionnement selon la polarité des solvants a abouti à l'extrait brut (E.Br) et ses fractions; l'extrait de chloroforme (E.Ch), l'extrait d'éthyle d'acétate (E.EtA) et l'extrait aqueux (E.Aq). La teneur en phénols totaux et en flavonoïdes a été quantifiée par des méthodes colorimétriques. Les résultats ont montré que la plus grande quantité de phénols totaux et de flavonoïdes a été trouvée dans E.EtA avec un taux de 495.12 ± 1.91 μg équivalent d'acide gallique (GAE)/mg d'extrait et 97.25 ± 2.84 μg équivalent de quercétine (QE)/mg d'extrait, respectivement. L'analyse par HPLC-DAD-MS/MS a été utilisée pour établir le profil chimique de E.Br, E.EtA et E.Aq, dont 49 composés ont été identifiés par des méthodes spectrométriques. Les composés phénoliques présents dans les extraits sont les acides hydroxybenzoïques, l'acide hydroxycinnamique, les oligomères d'acide hydroxycinnamique l'acide rosmarinique, l'acide salvianolique et leuteolin. L'activité antioxydante *in vitro* des extraits a été déterminée par plusieurs essais. Le test de piégeage de DPPH a montré que l'effet antiradicalaire le plus élevé est celui de l'E.EtA. Cet extrait a montré également une forte activité chélatrice (53,38 μg EDTA/mg d'extrait), un pouvoir réducteur puissant (929,73 μg acide ascorbique/mg extrait) et une activité anti-hémolytique très importante ($\text{HT}_{50} = 109,44$ min). Dans l'étude de la toxicité subaiguë, l'administration de l'E.Br et l'E.EtA à des souris *Swiss albinos* par gavage à des doses de 50, 200, 500, 1000 et 2000 mg/kg/jour pendant 21 jours n'a induit aucun signe visible de toxicité chez les souris testés dont la DL_{50} déterminée est supérieure à 2000 mg/kg. D'autre part l'évaluation de l'activité antioxydante *in vivo* a montré que l'administration de l'E.Br et l'E.EtA à des doses de 500 mg/kg/jour pendant 21 jours a augmenté le niveau du GSH et a diminué le taux de MDA dans le foie et le cerveau. De plus cette administration a augmenté significativement l'activité de CAT dans les reins. Par ailleurs l'étude de l'effet hépatoprotecteur d'une supplémentation quotidienne d'E.Br à des doses de 100, 250 et 500 mg/kg/jour pendant six jours chez les souris contre CCl_4 a montré que la dose 500 mg/kg a diminué significativement l'ALT, AST, ALP et MDA et a augmenté le CAT et le taux de GSH. Les résultats obtenus de cette étude ont révélé que l'E.Br et l'E.EtA de *Thymus pallidus*, possèdent une activité antioxydante puissante à la fois *in vitro* et *in vivo* et que l'effet hépatoprotecteur s'est amélioré par suite à une supplémentation de E.Br. De plus, *Thymus pallidus*, était non toxique en administration aiguë de leur extraits E.Br et E.EtA à des doses ≤ 2000 mg/Kg, ce qui indique clairement les bénéfices potentiels de la plante pour la santé dans les préparations alimentaires et pharmaceutiques.

Mots-clés: *Thymus pallidus*, Composés phénoliques, Activité antioxydante, Toxicité subaiguë, Activité hépatoprotectrice, HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

Abstract

Thymus pallidus, belonging to Lamiaceae Family, locally named « Khyata», is a medicinal plant widely used in food and Algerian folk medicine. The present study aims to assess the antioxidant and hepatoprotective activities, as well as the toxic effect of plant extracts. The extraction of the polyphenols from the aerial parts of the studied plant and its fractionation resulted in the crude methanolic extract (E.Br); chloroform extract (E.Ch), ethyl acetate extract (E.EtA) and aqueous extract (E.Aq) according to the polarity of the solvents used. Total phenols and flavonoids content were quantified by colorimetric methods. Results showed that E.EtA recorded the greatest amount of total phenols and flavonoids (495.12 ± 1.91 μg gallic acid equivalent (GAE)/mg of extract and 97.25 ± 2.84 μg quercetin equivalent (QE)/mg extract, respectively). Using HPLC-DAD-MS/MS analysis to establish the chemical profile of E.Br, E.EtA and E.Aq; 49 compounds were identified. The major phenolic compounds present in the extracts were hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acid, oligomers of hydroxycinnamic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid and leuteolin. The *in vitro* antioxidant activity of the extracts has been determined by several tests. DPPH test has shown that the highest scavenging effect was that of E.EtA. The same extract has also showed a strong chelating activity (53.38 μg EDTA/mg of extract), a powerful reducing power (929.73 μg ascorbic acid/mg extract) and a very significant anti-hemolytic property ($\text{HT}_{50} = 109.44$ min). In sub-acute toxicity study, the gavage of *Swiss albinos* mice by E.Br and E.EtA at doses of 50, 200, 500, 1000 and 2000 mg/kg/day for 21 days did not induced any visible sign of toxicity or mortality. Evaluation of the antioxidant activity *in vivo* has shown that the administration of E.Br and E.EtA at doses of 500 mg/kg/day for 21 days increased the level of GSH and decreased the level of MDA in the liver and brain. Moreover, this administration increased the activity of CAT in the kidneys. In addition, the study of the hepatoprotective effect of E.Br against CCl_4 -induced hepatotoxicity showed that the daily treatment of the mice at doses of 100, 250 and 500 mg/kg for six days, reduce the activity of ALT, AST and ALP, decrease the levels of MDA and increase the GSH level. The results obtained from this study showed that E.Br and E.EtA of *Thymus pallidus* had a strong antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*, and the hepatoprotective effect of E.Br was evident. Additionally, *Thymus pallidus* extracts are not toxic at a dose of $2000 \leq \text{mg/kg}$, which clearly indicates the potential health benefits of the plant in food and pharmaceutical preparations.

Keywords: *Thymus pallidus*, Phenolic compounds, Antioxidant activity, Sub-acute toxicity, Hepatoprotective effect, HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

Liste des abréviations

AAPH	2,2'-Azobis (2-amidinopropane) hydrochloride
ABTS	2, 2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6- acide sulfonique
ALT	Alanine aminotransférase
ANOVA	Analyse de variance
AST	Aspartate aminotransférase
BHT	Butylated hydroxytoluene
BT	Bilirubine totale
CAT	Catalase
DL₅₀	Dose létale de 50%
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	5,5 0- dithiobis-(2- acide nitrobenzoïque)
E.Aq	Extrait aqueux
E.Br	Extrait brut
E.Ch	Extrait du chloroforme
E.EtA	Extrait d'éthyle acétate
E.Hx	Extrait d'hexane
EAG	Equivalents d'acide gallique
EC₅₀	Concentration effectrice à 50%
EDTA	Ethylène diamine tétra acétique
EQ	Equivalents de quercétine
ERO	Espèce réactive d'oxygène
GPx	Glutathion réductase
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduite
HT₅₀	Mi-temps d'hymolyse 50% (Half-time of 50% hemolysis)
IC₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
MDA	Malondialdehyde
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
ONOO-	Peroxynitrite
PAL	Phosphatase alcaline
SD	Déviation standard
SEM	Erreur standard de la moyenne
SOD	Superoxyde dismutase
<i>T. pallidus</i>	<i>Thymus pallidus</i>
TBA	Acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloracétique
Vit.C	Vitamine C
XO	Xanthine oxydase

Liste des figures

Fig. 1: Processus de la peroxydation lipidique.....	7
Fig. 2: Antioxydants enzymatiques.....	11
Fig. 3: Elimination des radicaux libres par la vit. E, la vit. C et le glutathion.....	12
Fig. 4: Système de défense antioxydant (Enzymatique et non-enzymatique).....	14
Fig. 5: Diferentes classes de polyphénols.....	16
Fig. 6: Structure chimique de l'acide phénolique : l'acide de hydroxybenzoïque (A), et hydroxycinnamique (B).....	17
Fig. 7: Diferentes classes des flavonoïdes.....	18
Fig. 8: Strcure de resvératrol.....	19
Fig. 9: Réduction des radicaux libres par les composes phénoliques.....	21
Fig. 10: Chélation des radicaux libres par les composes phénoliques.....	21
Fig. 11: Organisation structurale et histologique du foie.....	30
Fig. 12: Phases de détoxification des xénobiotiques.....	31
Fig. 13: Differents radicaux libres dérivés de CCl ₄	37
Fig. 14: Aspect botanique de la plante <i>T. pallidus</i>	39
Fig. 15: Chromatogrammes d'analyse des extraits par HPLC-DAD. A: E.Br; B: E.EtA; C: E.Aq.....	60
Fig. 16: Cinétique d'inhibition de la XO par les extraits de <i>T. pallidus</i>	67
Fig. 17: Effet inhibiteur de différents extraits de <i>T. pallidus</i> sur l'activité XO.....	68
Fig. 18: Activité antiradicalaire des extraits et des standards par le test d'ABTS exprimé en valeurs EC ₅₀	70
Fig. 19: Activité anti hémolytique <i>in vitro</i> de vit. C et des extraits de <i>T. pallidus</i>	71
Fig. 20: Activité chélatrice des extraits de <i>T. pallidus</i> et de quercétine.....	73
Fig. 21: Pouvoir réducteur de la quercetine et des extraits de <i>T. pallidus</i>	75
Fig. 22: Piégeage du peroxyde d'hydrogène par les extraits de <i>T. pallidus</i> exprimé en valeurs EC ₅₀	76
Fig. 23: Cinétique de blanchissement du β-carotène à 490 nm en présence des extraits et BHT.	78
Fig. 24: Activité antioxydante relative des extraits et des standards (24 h) dans le système β-carotène/acide linoléique.....	79
Fig. 25: Activité antiradicalaires des extraits et des standards par le test DPPH exprimé en valeurs EC ₅₀	81

Fig. 26: Activité anti hémolytique de différents groupe traits et groupe témoin	86
Fig. 27: Activité de la catalase tissulaire dans les différents groupes	87
Fig. 28: Teneur en glutathion réduit (GSH) dans différent groupes	88
Fig. 29: Profil de la peroxydation lipidique dans les différents groupes	90
Fig. 30: Pouvoir réducteur du plasma chez les souris traitées par des extraits de <i>T. pallidus</i> . 87	
Fig. 31: Potentiel antioxydant du plasma, chez des souris traitées par les extraits de <i>T. pallidus</i> , par test le test DPPH	93
Fig. 32: Activité anti hémolytique de différents groupe traits et groupe témoin	95
Fig. 33: Activité de la catalase hépatique des souris traitées par l'extrait methanolique et vit. C dans l'hépatotoxicité induite par CCl ₄	96
Fig. 34: Teneur en glutathion réduit (GSH) hépatique des souris traitées par l'extrait methanolique et vit. C dans l'hépatotoxicité enduite par CCl ₄	97
Fig. 35: Profile de la peroxydation lipidique hépatique des souris traitées par l'extrait methanolique et vit. C dans l'hépatotoxicité induite par CCl ₄	98

Liste des tableaux

Tableau 1: Les principales affections liées à la production des radicaux libres et des EOR	9
Tableau 2: Estimation phytochimique de <i>T. pallidus</i>	40
Tableau 3: Le rendement et la teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits de <i>T. pallidus</i>	57
Tableau 4: Identification des composés des extraits de <i>T. pallidus</i> par HPLC-DAD-MS.....	60
Tableau 5: Etude de toxicité de l'E.Br et E.EtA	84
Tableau 6: Paramètres biochimiques chez des souris traitées avec l'E.Br et l'E.EtA de <i>T. pallidus</i>	86

Sommaire

Introduction	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	
1. Stress oxydant.....	3
1.1. Définition	3
1.2. Espèces réactives de l'oxygène et les radicaux libres	3
1.3. Sources des espèces réactives oxygénées.....	4
1.3.1. Sources endogènes	4
1.3.2. Sources exogènes	6
1.4. Cibles biologiques des espèces réactives oxygénées	6
1.4.1. Lipides.....	6
1.4.2. Protéines.....	7
1.4.3. Acides nucléiques	8
1.5. Stress oxydatif et pathologies humaines	9
1.6. Antioxydants	10
1.6.1. Antioxydants enzymatiques	10
1.6.2. Antioxydants non enzymatique.....	12
2. Composés phénoliques	16
2.1. Classification	16
2.1.1. Acides phénoliques	16
2.1.2. Flavonoïdes	17
2.1.3. Stilbènes	18
2.1.4. Tannins.....	19
2.2. Activités biologiques de polyphenols	20
2.3.1. Activité antioxydante	22
2.3.2. Activité anti-inflammatoire.....	22
2.3.4. Activité anticancéreuse	25
2.3.5. Activité antimicrobienne.....	26
2.4. Biodisponibilité des composés phénoliques.....	26
2.4.1. Absorption.....	27
2.4.2. Métabolisme.....	27
3. Hépatotoxicité	2
3.1. Hépatotoxicité médicamenteuse.....	32
3.2. Hépatotoxicité des produits chimiques	33
3.3. Evaluation de l'hépatotoxicité.....	33
3.4. Hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone	34
4. <i>Thymus pallidus</i>	37
4.1. Généralités.....	37

4.2. <i>Thymus pallidus</i>	37
4.2.1. Aspect botanique.....	38
4.2.2. Taxonomie	39
4.2.3. Utilisation traditionnelle.....	40
4.2.4. Composition chimique	40

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes	42
1. Matériel	42
1.1. Matériel végétal et animal	42
1.2. Réactifs et produits chimiques	42
2. Méthodes	42
2.1. Extraction	42
2.2. Caractérisation phytochimique.....	43
2.2.1. Dosage des polyphénols et flavonoïdes	43
2.2.2. Analyses des extraits par HPLC-DAD-ESI-MS/MS	44
2.3. Etude de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	45
2.3.1. Inhibition de la xanthine oxydase	45
2.3.2. Test d' ABTS ^{•+}	46
2.3.3. Test de l'hémolyse	46
2.3.4. Chélation du fer ferreux	47
2.3.5. Pouvoir réducteur	47
2.3.6. Piégeage du peroxyde d'hydrogène	48
2.3.7. Inhibition de la peroxydation lipidique par le test de β -carotène.....	48
2.3.8. Test DPPH.....	49
2.4. Etude de la toxicité.....	50
2.5. Etude <i>in vivo</i> de l'activité antioxydante des extraits	50
2.5.1. Capacité antioxydante totale du sang	51
2.5.2. Aactivité de la catalase tissulaire	52
2.5.3. Dosage de la glutathion tissulaire	52
2.5.4. Estimation de la peroxydation lipidique	52
2.5.5. Pouvoir réducteur plasmatique.....	53
2.5.6. Capacité antioxydante plasmatique <i>vis-à-vis</i> le radical DPPH	53
2.6. Évaluation de l'activité hépatoprotectrice	53
2.6.1. Détermination/évaluation des paramètres sérique de l'hépatotoxicité.....	54
2.6.2. Détermination des marqueurs d'hépatotoxicité/stress oxydative.....	55
2.7. Analyses statistiques	55

Resultats et Discussion

1. Extraction	56
---------------------	----

2. Analyse des extraits par HPLC-DAD-ESI-MS/MS	58
2.1. Les acides hydroxybenzoïques	60
2.2. Les acides hydroxycinamiques.....	60
2.3. Les flavonoïdes.....	63
2.4. Les composés Non-phénoliques	64
3. Etude de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	67
3.1. Inhibition de la xanthine oxydase.....	67
3.2. Test d'ABTS	69
3.3. Activité anti hémolytique	71
3.4. Chélation du fer ferreux	73
3.5. Pouvoir réducteur	75
3.6. Piégeage du peroxyde d'hydrogène	77
3.7. Test de β -carotène/l'acide linoléique	79
3.8. Test de DPPH.....	81
4. Etude de la toxicité et détermination de la DL ₅₀	84
4.1. Toxicité.....	84
4.2. Paramètres biochimiques.....	85
5. Etude <i>in vivo</i> de l'activité antioxydante des extraits	86
5.1. Capacité antioxydante totale du sang	88
5.2. Activité de la catalase tissulaire	88
5.3. Dosage de la glutathion tissulaire.....	88
5.4. Estimation de la peroxydation lipidique.....	90
5.5. Pouvoir réducteur plasmatique.....	91
5.6. Capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis le radical DPPH	92
6. Activité hépatoprotectrice	94
6.1. Détermination des paramètres biochimiques/sérique.....	94
6.2. Activité de la catalase tissulaire	96
6.3. Dosage de la glutathion tissulaire.....	97
6.4. Estimation de la peroxydation lipidique.....	98
Conclusion.....	100
Les références bibliographies	103

Introduction

Le stress oxydatif est défini, au sein d'un même organisme, comme un déséquilibre entre la production d'oxydants et les mécanismes de défense anti-oxydants. Ce déséquilibre est étroitement associé à la production en excès des espèces réactives oxygénées (ERO). Les ERO sont des espèces chimiques oxygénées produites dans l'organisme par divers mécanismes, sont impliquées dans des processus physiologiques à des faibles quantités. Les ERO rendues chimiquement très réactives par la présence d'un électron non apparié dans l'orbitale externe. En effet, les ERO, représentant à la fois des radicaux libres et espèces radical non-libre (Sies, 2019). Cependant, en raison de leur potentiel hautement réactif, l'excès de leur production peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Ces dommages peuvent aboutir à de nombreuses maladies chroniques et dégénératives tels que le cancer, le diabète, les maladies inflammatoires, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (Liguori *et al.*, 2018). Pour cela, l'organisme dispose d'un système de défense antioxydants qui consiste en un réseau enzymatique et non enzymatique, qu'agissant en synergie pour rétablir l'équilibre pro-oxydant/antioxydant, afin de réduire les conséquences du stress oxydant et préserver ainsi les performances physiologiques (Neha *et al.*, 2019). Cependant, il y a une préoccupation croissante compte aux risques et effets secondaires des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires et/ou destinés à la lutte contre le stress oxydant et les maladies associées. De ce fait, la recherche et l'exploitation de nouvelles molécules naturelles bioactives aux effets secondaires mineurs ou inexistantes, comme alternative aux molécules synthétiques est devenue une priorité pour la recherche scientifique. Les plantes médicinales et aromatiques constituent une source importante et inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées (Reid *et al.*, 2018; Emilie *et al.*, 2019). Il est largement démontré que ces propriétés thérapeutiques sont fortement corrélées à la présence de centaines de composés bioactifs. Connues sous la dénomination de métabolites secondaires, ces

composés constituent une large gamme de biomolécules, telles que les polyphénols, les alcaloïdes, les terpènes, etc... (Neha *et al.*, 2019).

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans les plantes et les produits végétaux. La reconnaissance des composés phénoliques comme antioxydants naturels est maintenant bien acquise et pour une part à l'origine du regain d'intérêt que l'on porte à ces composés dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie (Watson *et al.*, 2019).

Dans ce contexte, cette étude a été menée sur *Thymus pallidus* Coss., plante médicinale de la pharmacopée Algérienne. *T. pallidus* appartient à la famille Lamiacées et connue localement sous le nom de « Khyata ». Elle est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies telles que les troubles intestinaux et digestifs, les maladies inflammatoires et les infections bactériennes. Pour cela, notre travail vise à atteindre les objectifs suivants:

- Préparation des extraits organiques à partir de la partie aérienne de *T. pallidus*.
- Détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes présent dans les extraits de la plante.
- Analyse et caractérisation phytochimique des extraits par HPLC-ESI-DAD-MS/MS.
- Évaluation de l'activité antioxydante des extraits par des tests *in vitro* et *in vivo*
- Évaluation de l'activité hépatoprotectrice des extraits contre l'hépatotoxicité induite par le CCl₄

Synthèse

bibliographique

1. Stress oxydant

1.1. Définition

Le stress oxydant ou le stress oxydatif, est défini comme un déséquilibre entre la production d'oxydants et les mécanismes de défense antioxydant au sein d'un même organisme, ce qui conduit à des dommages dans les biomolécules comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Niki, 2018; Tu *et al.*, 2019). Ces dommages sont impliqués dans le développement de nombreuses pathologies chroniques telles que le diabète, le cancer, les maladies inflammatoires, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (Matschke *et al.*, 2019). En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent les ERO qui jouent un rôle important dans les fonctions physiologiques des organismes. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité des radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer (Niki, 2018; Tu *et al.*, 2019).

1.2. Espèces réactives de l'oxygène et radicaux libres

Les radicaux libres sont définis comme étant des molécules ou des espèces chimiques qui portent un électron non apparié (célibataire) sur leur orbite externe. Du fait de la présence d'un électron célibataire, les radicaux libres présentent une grande instabilité et très réactifs, ont une durée de vie courte et sont capables de réagir avec de nombreux composés (Peña-Bautista *et al.* 2019). Plus de 90%, de l'oxygène consommé par les cellules est catalytiquement réduit par quatre électrons pour produire deux molécules d'eau. Cependant, l'O₂ peut être réduit par moins de quatre électrons, par certaines oxydases, donnant ainsi naissance à des espèces oxygénées partiellement réduites et hautement réactives appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les espèces réactives oxygénées (ERO) incluent les radicaux libres comme le radical hydroxyl (OH·), le radical superoxyde (O₂^{·-}) et sa forme protonnée (HO₂·), le radical peroxy (ROO·) et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et

l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) sont des molécules hautement réactives produites dans les organismes vivant sous des conditions physiologiques et pathologiques (Patterson *et al.*, 2019). D'autres espèces radicalaires dérivent de l'azote nommés les espèces réactives du nitrogène incluent le radical monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$), l'anion peroxydinitrite (ONOO^-), le radical dioxyde d'azote ($\text{NO}_2\cdot$) et d'autres oxydes d'azote sont produits par la réaction du monoxyde d'azote avec $\text{O}_2\cdot$ (Singh *et al.*, 2019).

1.3. Sources des espèces réactives oxygénées

1.3.1. Sources endogènes

Les mitochondries constituent la principale source de production des ERO dans les systèmes biologiques. Pendant la respiration cellulaire l'oxygène est transformé en anion superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) au cours de la réduction partielle de l'ubiquinone/ubisemiquinone/ubiquinol par le complexe I et III respectivement (Di Meo *et al.*, 2016). Le complexe NADH-ubiquinone oxydoréductase et l'ubiquinone-cytochrome c réductase sont alors d'importants complexes membranaires mitochondriaux qui peuvent générer de $\text{O}_2\cdot^-$ et de H_2O_2 .

L'inflammation est par ailleurs une source importante d'ERO. Glennon et ses collaborateurs (2018) ont rapporté que lors des processus inflammatoires, les neutrophiles activés produisent l'anion superoxyde via l'action de la NADPH oxydase liée à la membrane sur l'oxygène moléculaire. Les neutrophiles produisent aussi le radical de monoxyde d'azote qui est à l'origine d'une molécule plus réactive, le peroxydinitrite (ONOO^-), un puissant oxydant qui peut se décomposer pour former le radical hydroxyle (Singh *et al.*, 2019).

Plusieurs systèmes enzymatiques produisent les ERO. La cytochrome P450 réduit directement O_2 en $\text{O}_2\cdot^-$, et elle peut aussi prendre une voie alternative appelée "cycles redox" dans lesquels un substrat accepte un électron du cytochrome P450 et le transfère à l'oxygène générant l'anion superoxyde (Yue *et al.*, 2018). Le peroxyosome contient de nombreuses enzymes générant du H_2O_2 , ce dernier est le substrat de la catalase peroxyosomale (Ganguli *et al.*, 2019). La xanthine

oxydoréductase (XOR) est une source importante d'ERO. La xanthine oxydoréductase catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et par la suite de la xanthine en acide urique en produisant l'anion superoxyde (Battelli *et al.*, 2018).

La NADPH oxydase est une enzyme hémoprotéine joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire. Elle se trouve dans différents types cellulaires; les cellules phagocytaires, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules de muscles lisses. Lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d'une grande quantité de l' $O_2^{\cdot-}$ et ses dérivés (Magnani et Mattevi, 2019). La NADPH oxydase des cellules non phagocytaires, produise aussi des radicaux libres en faible quantité (Ewald *et al.*, 2017).

La dismutation de $O_2^{\cdot-}$ spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases est la source majeure de H_2O_2 . De plus, le H_2O_2 est aussi produit *in vivo* par différentes oxydases, incluant les aminoacides oxydases. Le H_2O_2 peut être réduit par la réaction d'Haber-Weiss engendrant l'ion OH^{\cdot} inoffensif et un radical hydroxyle HO^{\cdot} plus agressif (Zhao *et al.*, 2019).

La nitric oxide synthase (NOS) générateur important du radical monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Le NO^{\cdot} permet la production des autres RNS tel que le peroxyde d'azote $ONOO^{\cdot}$ (Liguori *et al.*, 2018).

Les lipooxygénases et les cyclooxygénases présentent aussi une source importante de production de ERO dans les parois vasculaires, ces enzymes catalysent l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) ou des acides gras estérifiés comme les esters de cholestérol et celles trouvées dans les phospholipides pour donner des dérivés d'acides gras hydroperoxydes toxiques pour la cellule (Munoz *et al.*, 2015).

1.3.2. Sources exogènes

Une large variété de xénobiotiques (toxines, pesticides, herbicides, métaux lourds etc...) et médicaments (antibiotiques, anticancéreux, etc...) peuvent contribuer à la production des ERO (El-Demerdash *et al.*, 2018). Les rayonnements, qu'ils soient UV, X ou γ , peuvent par différents mécanismes induire la synthèse de radicaux libres (Tsai *et al.*, 2017). Les polluants de l'air, comme la fumée des cigarettes et les contaminants industriels, constituent une source importante de ERO, ils attaquent et causent des dommages dans l'organisme que ce soit par interaction directe avec la peau ou après inhalation dans les poumons (Al-Gubory, 2014).

1.4. Cibles biologiques des espèces réactives oxygénées

La surproduction des radicaux libres et des différentes espèces réactives produits à partir des sources endogènes et exogènes peut conduire au dommage des composants cellulaires et à l'altération des fonctions cellulaires, de plus les effets toxiques des radicaux libres peuvent conduire à la mort cellulaire. Les cibles biologiques des radicaux libres sont en grande partie les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Carocho *et al.*, 2018).

1.4.1. Lipides

Les lipides membranaires sont les cibles les plus susceptibles à l'action des ERO et des radicaux libres à cause de la présence des lipides insaturés ; l'acide linoléique et l'acide arachidonique (Zielinski et Pratt, 2017). L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'une molécule d'acide gras polyinsaturé initie le processus de la peroxydation lipidique (**Fig. 1**). Un atome d'hydrogène est pris d'une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturé résultant en un nouveau radical libre (Taso *et al.*, 2019). Ces radicaux peuvent déclencher une chaîne de réactions de peroxydation au niveau des acides gras des phospholipides membranaires, conduisant à l'altération de la membrane et la perte de l'organisation de sa structure de bicouche lipidique qui est nécessaire à la fonction des enzymes liées et des récepteurs (Gavric *et al.*, 2017). Dans une première étape de la peroxydation, les acides gras se transforment en

peroxydes lipidiques puis sous l'action des métaux de transition ils se décomposent en une série de sous-produits à savoir les aldéhydes et les hydrocarbures. La malonedialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (HNE) sont des exemples d'aldéhydes résultants de la peroxydation lipidique et sont utilisés comme marqueurs suivis lors de la détection de peroxydation lipidique chez les patients (Gaschler et Stockwell, 2017). Les ERO ainsi que la MDA et le HNE peuvent aussi oxyder les lipoprotéines de faible densité (LDL), riches en acides gras polyinsaturés causant un nombre de changements structuraux et fonctionnels. Ces LDL modifiées sont reconnues par les macrophages au sein desquels elles s'accumulent en formant des cellules spumeuses. En s'accumulant dans l'espace interstitiel, ces cellules contribuent au développement de l'athérosclérose (Hematyar *et al.*, 2019).

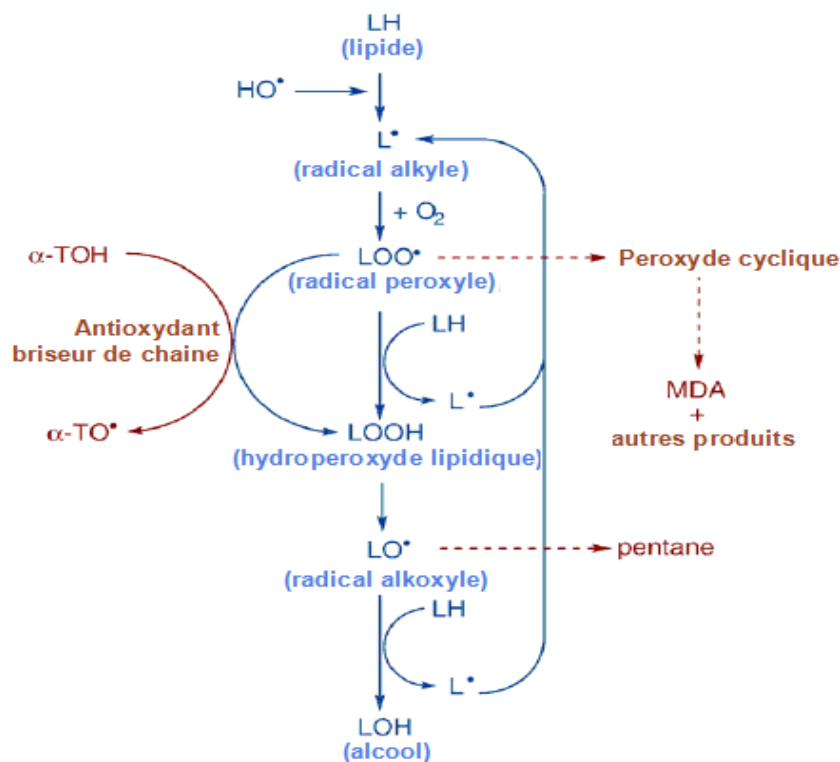


Fig. 1: Processus de la peroxydation lipidique (Gavric *et al.* 2017).

1.4.2. Protéines

Les radicaux libres sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH), dont le site actif contient le groupement Fe-S sont

également très sensibles à l'inactivation par l' $O_2^{\bullet-}$, les modifications structurales des protéines et/ou l'altération de la fonction sont les conséquences majeures (Hematyar *et al.*, 2019). Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures. De nombreux enzymes cellulaires et protéines de transport vont ainsi être oxydées et inactivées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzymes, canaux et récepteurs), et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Rosenfeld *et al.*, 2018). La modification de l'état redox de ces groupements conduit à la déformation de la cellule, la déplétion des réserves calciques et le changement de l'état d'ouverture des canaux potassiques et calciques. En addition, les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine et l'histidine, sur lesquels le OH^{\bullet} s'additionne, modifiant la conformation de la protéine (Hematyar *et al.*, 2019).

1.4.3. Acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des molécules très sensibles à l'attaque des EOR. L'attaque radicalaire se manifeste soit directement en entraînant l'oxydation des bases et engendrant un grand nombre de bases modifiées, soit elle cible la liaison entre la base et le désoxyribose créant un site abasique, soit cible le sucre lui-même créant une coupure de simple brin (Van Houten *et al.*, 2019). Les bases composant l'ADN, particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation par les radicaux libres. La réduction de la guanine résulte de l'ouverture de sa structure cyclique formant le formamidopyrimidine. Son oxydation, cependant, conduit à la formation du 8-hydroxy-2' déoxyguanosine, un produit majeur dont la présence dans l'urine sert de bio-marqueur du dommage oxydatif de l'ADN et qui est capable d'induire des mutations spécifiques conduisant au développement du cancer (Nemmar *et al.*, 2016). Le radical NO^{\bullet} et leurs dérivés tels que $NO^{\bullet-2}$, $ONOO^{\bullet-}$, N_2O_3 et HNO_2 sont des agents mutagènes

et ont la capacité d'introduire plusieurs modifications sur les bases d'ADN par des réactions de nitration, nitrosation, et désamination (Klaunig et Wang, 2018). Les dommages d'ADN ont comme conséquence une transcription réduite d'ARNm et, en conséquence, une perte de fonction des biomolécules protéiques (Van Houten *et al.*, 2019).

1.5. Stress oxydatif et pathologies humaines

De nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de différentes pathologies humaines, allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (**Tableau 1**). Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement. De plus, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés (Poprac *et al.*, 2017; Liguori *et al.*, 2018).

Tableau 1. Les principales affections liées à la production des radicaux libres et des EOR.

Pathologie	Références
Maladies inflammatoires	(Qu <i>et al.</i> , 2019)
Diabète	(Oguntibeju, 2019)
Cancer	(Nichols <i>et al.</i> , 2017)
Les maladies cardiovasculaires	(Incalza <i>et al.</i> , 2017)
Alzheimer, Parkinson	(Van Raamsdonk <i>et al.</i> , 2017)
Arthrite rhumatoïde	(Pradhan <i>et al.</i> , 2019)
Allergie et Maladies auto-immunes	(Colucci <i>et al.</i> , 2015)
Vieillessement	(Liguori <i>et al.</i> , 2018)
Athérosclérose	(Bryk <i>et al.</i> , 2017)

1.6. Antioxydants

Le système de défense antioxydant correspond l'ensemble des moyens mis en œuvre pour contrôler l'oxydation et ses effets négatifs. Il comprend plusieurs lignes de défenses qui visent à prévenir la formation des radicaux libres, les neutraliser quand ils sont déjà formés, réparer leurs dégâts et/ou prévenir les conditions favorables à leur formation, comme par exemple, en bloquant/séquestrant les atomes de fer, qui agissent comme des catalyseurs dans la formation de radicaux libres (réaction de Fenton). Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (Dias, 2019).

1.6.1. Antioxydants enzymatiques

Il existe trois enzymes; la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (Ighodaro et Akinloye, 2018).

✚ La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en oxygène et hydrogèneperoxyde (H_2O_2). Cette enzyme existe sous trois isoformes deux sont présentes à l'intérieur des cellules (SOD mitochondriale ayant le manganèse dans son site actif (MnSOD), ainsi qu'une enzyme cytosolique, ayant le zinc dans son site actif (ZnSOD), tandis que l'autre est située dans l'espace extracellulaire (SOD ayant le cuivre et le zinc (Cu-ZnSOD) (Younus, 2018).

✚ La catalase (CAT) est une enzyme qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et oxygène moléculaire (Ighodaro et Akinloye, 2018). Elle est présente dans de nombreux tissus et particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. Les catalases sont localisées dans les peroxysomes, cette compartimentation l'empêche d'être un accepteur pour l' H_2O_2 formé dans le cytosol et les mitochondries (Awad *et al.*, 2018).

✚ La Glutathion peroxydase (GPx) et la Glutathion réductase (GR) sont localisées dans le cytosol et les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), mais aussi

d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH) (Benhar, 2018). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (**Fig. 2**). Cependant, d'autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases et les thioredoxines peroxydases sont impliquées dans la défense antioxydante de l'organisme et utilisent le NADPH comme donneur d'équivalent réducteur, celui-ci constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante (Ulrich et Jakob, 2019).

✚ Les peroxyredoxines sont également connues sous le nom de thiorédoxine peroxydase, dont six sont trouvées chez les mammifères principalement dans le cytosol et les mitochondries. Ces protéines se lient également au noyau et aux membranes cellulaires. Les peroxyredoxines convergent à la fois H_2O_2 , NO^\bullet et NOO^\bullet grâce à l'activité peroxydase (Nicolussi *et al.*, 2017). Malgré leur faible efficacité par rapport à la CAT et à la GPx, ces protéines jouent un rôle important dans l'élimination des hydroperoxydes en raison de leur valeur perçue, représentant 0,1-0,8% des protéines cellulaires libres (Ulrich et Jakob, 2019).

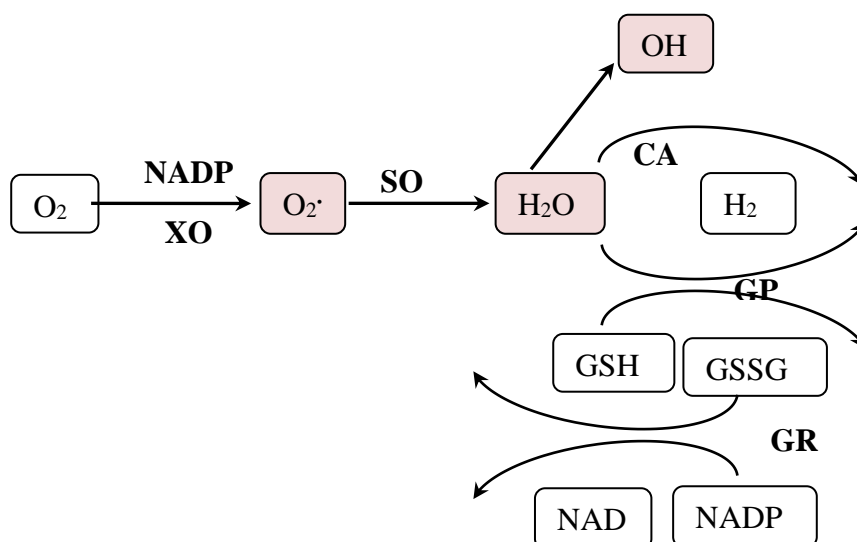


Fig. 2: Antioxydants enzymatiques (Ulrich et Jakob, 2019).

1.6.2. Antioxydants non enzymatique

Contrairement aux antioxydants enzymatiques, la plupart de ces composés ne sont pas produits par l'organisme et peuvent provenir de nourriture. Ces composés comprennent de petites molécules telles que les vitamines, Les caroténoïdes, les polyphenols, le glutathion et l'ubiquinone. Les antioxydants non enzymatiques sont caractérisés par de faibles poids moléculaires et la capacité à prévenir et/ou à réduire les dommages au stress oxydatif (Nimse et Pal, 2015).

✚ La vitamine E possède quatre isomères de tocophérol, α , β , γ et δ avec une activité antioxydante variable (Luciano *et al.*, 2017). La vitamine E présente dans les huiles végétales, les pépins, le germe et les grains de blé (Blumberg *et al.*, 2018). L' α -tocophérol (α -Toch) est la forme la plus active de la classe des tocophérols, elle est liposoluble, se fixe sur la membrane cellulaire et inhibe la chaîne de réactions de peroxydation des lipides en capturant le radical lipidique peroxyde ($\text{LOO}\cdot$), alkoxy ($\text{LO}\cdot$) et alkyl ($\text{L}\cdot$) (Fig. 3). Elle devient à son tour un radical moins actif que le $\text{LOO}\cdot$ et pourra alors être pris en charge par une autre molécule antioxydante (Liu *et al.*, 2018).

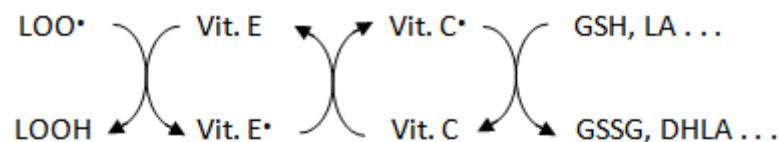


Fig. 3: Elimination des radicaux libres par la vit. E, la vit. C et le glutathion (Ashor *et al.*, 2016).

✚ L'acide ascorbique ou vitamine C est hydrosoluble, Même si la plupart des mammifères peuvent la synthétiser, l'organisme humain en a perdu la capacité au cours de l'évolution. Il doit donc la puiser chaque jour dans les aliments. Les principales sources de vitamine C sont les fruits (en particulier les baies) et les légumes-feuilles (Ashor *et al.*, 2016). La Vitamine C est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés aussi bien hautement réactifs tels que les radicaux $\text{d}'\text{OH}\cdot$ et $\text{d}'\text{O}_2\cdot^-$ (Smirnoff, 2018). Sa capacité de donation d'électrons dans une large

gamme de réactions enzymatiques et non enzymatiques. La Vit. C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs de radicaux libres. Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol (Xiong *et al.*, 2017). Ce qui lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises (Ashor *et al.*, 2016).

✚ Le glutathion (GSH) est un tripeptide(L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) dont la fonction thiol lui confère un rôle d'antioxydant (Pacula *et al.*, 2017). Le glutathion intervient comme agent détoxiquant dont il participe à la neutralisation de certains radicaux libres et il agit comme cofacteur de l'enzyme glutathion peroxydase (GPx). Le glutathion réduit (GSH), réduit le H₂O₂ et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la GPx (Pacula *et al.*, 2017). Le glutathion peut aussi réduire d'autres radicaux libres tels que HOCl, LO \cdot , LOO \cdot et l'O₂ \cdot^- , comme il peut réduire d'autres radicaux de nitrogène et de carbone pour former le radical thiyl (GS \cdot) (**Fig. 4**). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H₂O₂ est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Herzog *et al.*, 2019).

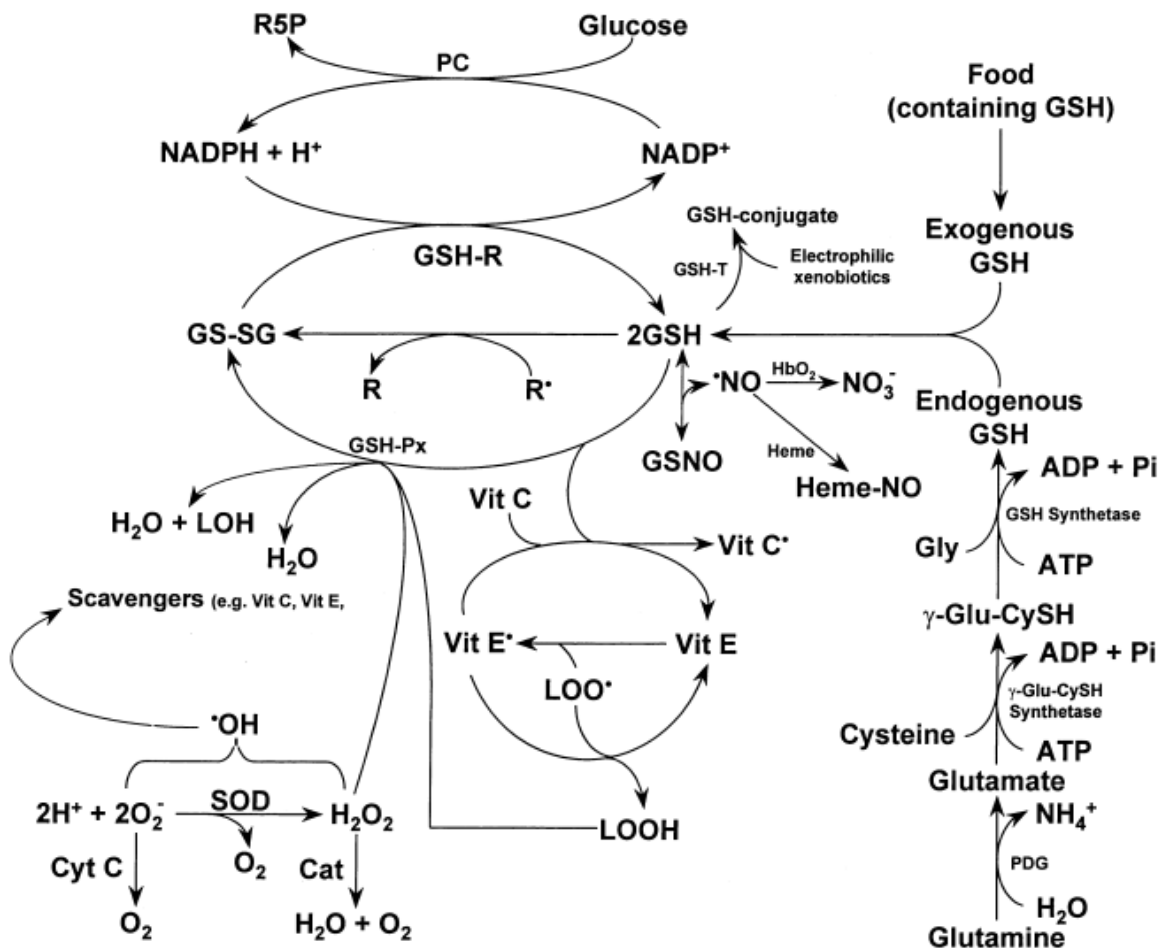


Fig. 4: Système de défense antioxydant (Enzymatique et non-enzymatique) (Mazzetti *et al.*, 2015).

✚ Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles jaunes, orangée à rouge, synthétisés par les plantes et les microorganismes. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont généralement de bons capteurs des radicaux hydroxyles et peroxydes ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique (Zuluaga *et al.*, 2017). En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capter l'oxygène singulet (1O_2) en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Eggersdorfer et Wyss, 2018).

✚ Les polyphénols sont des métabolites secondaires d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal. Plusieurs études ont montré qu'il y a un rapport

inverse entre la prise d'aliments riches en polyphénols (les fruits et les légumes) et le risque des maladies liées à l'âge comme les maladies neurodégénératives et les maladies cardiovasculaires (Hahn *et al.*, 2017; Fraga *et al.*, 2019). Cette relation est souvent attribuée aux puissantes activités anti-oxydantes des flavonoïdes et d'autres polyphénols associées à leurs propriétés redox permettant d'éliminer ou capture les effets d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que de chélater les différents métaux de transition et inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ERO comme la xanthine oxydase (Xu *et al.*, 2017; Serino et Salazar, 2019).

2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal. Les composés phénoliques naturels sont caractérisés par au moins un cycle aromatique et par un ou plusieurs groupes hydroxyle attachés (Watson, 2018).

2.1. Classification

Les composés phénoliques peuvent être classés en fonction du nombre et de la disposition de leurs atomes de carbone en plusieurs groupes (**Fig. 5**).

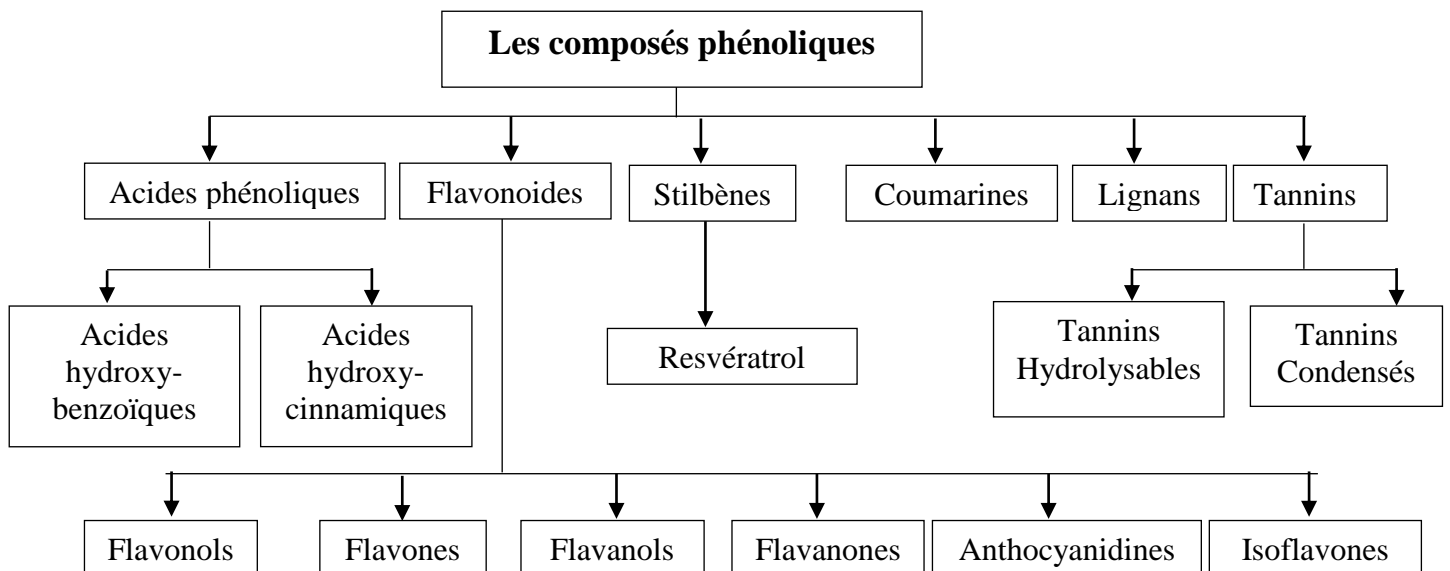


Fig. 5: Diferentes classes de polyphenols (Watson, 2018).

2.1.1. Acides phénoliques

Un acide phénolique ou acide-phénol est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Singla *et al.*, 2019). Les acides phénoliques sont divisés en deux classes:

✚ Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque (dérivent par hydroxylation de l'acide benzoïque) et ont une formule de base de type C6-C1 (**Fig. 6**). Les dérivés substitués des acides hydroxybenzoïques sont les acides phénoliques prédominants

dans les plantes. Les acides hydroxybenzoïques qui se produisent fréquemment dans les aliments comme des esters simples avec de l'acide quinique ou du glucose sont : l'acide protocatéchique, vanillique, ellagique gallique, syringique, salicylique et l'acide gentsique (Călinoiu et Vodnar, 2018).

✚ Les acides hydroxycinnamiques sont des dérivés qui appartiennent à la famille des phénylpropanoïdes, qui représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) provient de celle de l'acide cinnamique. Les molécules de base de la série hydroxycinnamiques sont l'acide caféique, *p*-coumarique, ferulique et l'acide sinapique (**Fig. 6**). Ces acides sont rarement présents à l'état libre et existent généralement sous forme d'esters ou de glycosides (Bijalwan *et al.*, 2016).



Fig. 6 : Structure chimique de l'acide phénolique : l'acide de hydroxybenzoïque (A), et hydroxycinnamique (B) (Călinoiu et Vodnar, 2018).

2.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont un groupe de composés naturels avec des structures phénoliques variables. En 1930, une nouvelle substance a été isolée des oranges. À cette époque, ils pensaient qu'il appartenait à une nouvelle classe de vitamines et était nommé vitamine P. À posteriori, il est apparu que ce composé était la rutine flavonoïde et depuis lors, plus de 10000 variétés de flavonoïdes ont été identifiées (Escobar *et al.*, 2017). Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs, des fruits et des feuilles et représentent une source importante d'antioxydants. Chimiquement, les flavonoïdes sont formés par une structure C6-C3-C6, qui se compose de deux cycles benzéniques liés par une chaîne à trois atomes de carbone qui forment un hétérocycle oxygéné (**Fig. 7**). Ils sont divisés en 6 classes:

flavone, flavanols ou flavan-3-ols, flavanones, Isoflavones, Flavones et anthocyanidins (Abotaleb *et al.*, 2019). Les différentes classes de flavonoïdes diffèrent par le niveau d'oxydation et le modèle de substitution du cycle C, tandis que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par le modèle de substitution des cycles (Perez-Vizcaino et Fraga, 2018). Les flavonoïdes dans la nature se présentent principalement sous forme de glycosides, d'aglycones (en particulier les flavanols) et, dans quelques cas, de dérivés méthylés (**Fig. 7**). La structure flavonoïde de base est l'aglycone. Lorsque des glycosides se forment, la liaison glycosidique est normalement située en position 3 ou 7 et le sucre peut être du L-rhamnose, du D-glucose, du glucorhamnose, du galactose ou de l'arabinose (Wang *et al.*, 2018).

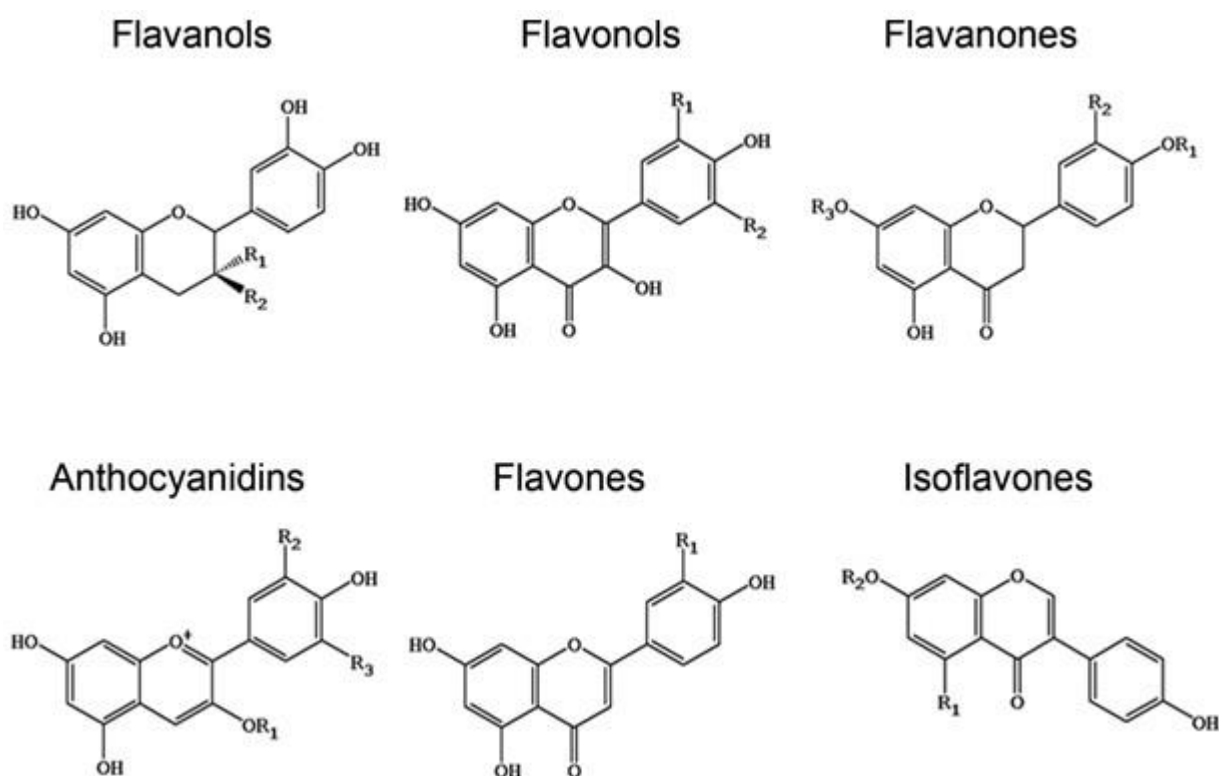


Fig. 7: Diferentes classes des flavonoïdes (Abotaleb *et al.*, 2019).

2.1.3. Stilbènes

Les stilbènes ou les stilbénolides sont des polyphénols naturels formés à partir d'une structure comportant deux noyaux benzéniques liés par un pont de deux carbones C6-C2-C6. Ce sont des métabolites produits par les plantes en défense (des phytoalexines antifongiques ou antimicrobiennes) ou bien, ce sont parfois des régulateurs de croissance (De Filippis *et al.*,

2019). Les stilbénoides possèdent plusieurs activités biologiques: antimicrobiennes, antitumorale, antiangiogénique, et anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique (Akinwumi *et al.*, 2018). Les stilbènes se rencontrent dans de nombreux végétaux supérieurs, sous forme libres ou hétérosides, parfois polymères (**Fig. 8**). Le principal stilbène alimentaire est le resvératrol, en particulier le *trans*-resvératrol et son glucoside, ont acquis une attention mondiale importante en raison de sa propriété bénéfique pour la santé comme anticancérogènes et antitumorales (Galiniak *et al.*, 2019).

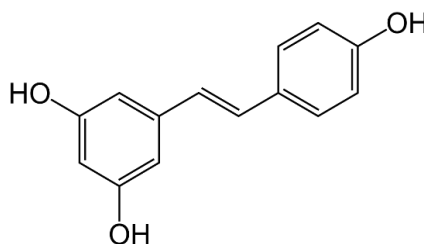


Fig. 8: La structure de resvératrol (Galiniak *et al.*, 2019).

2.1.4. Les tannins

Les tannins sont des polyphénols polaires de poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Da. Ils sont caractérisés par leurs activités biologiques ou thérapeutiques tels que : l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antifongique, antitumorale, antivirale et antidiarrhéique (Fraga *et al.*, 2019). Les tannins sont subdivisés en deux classes différentes par leur réactivité chimique et par leur composition, largement distribués chez les végétaux supérieurs.

✚ **Les tannins hydrolysables** sont des esters formés à partir d'un sucre (généralement le glucose ou de l'acide quinique) et d'un nombre variable de molécules d'acide phénolique (acide gallique, dans le cas des tannins galliques, ou acide hexahydroxydiphénique (HHDP), dans le cas des tannins ellagiques). Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique (Tuominen et Salminen, 2017).

✚ **Les tannins condensés** sont des oligomères ou polymères formés par la condensation des unités de flavanols (flavan-3-ols et flavan-3-4-diols). Ils sont constitués d'unités de flavan-

3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone de type 4→8 ou 4→6. Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse mais le traitement chimique fort permet de produire les pigments colorés formés d'anthocyanidols (Gourlay et Constabel, 2019).

2.2. Activités biologiques des polyphénols

Comme la plupart des métabolites secondaires, les composés phénoliques sont la première ligne de défense des plantes. Ils sont peut-être les groupes bioactifs nutritifs les plus importants dans l'alimentation (Cory *et al.*, 2018). Parmi les divers avantages potentiels pour la santé des polyphénols alimentaires, leur capacité de prévenir les dommages oxydatifs et de réduire l'inflammation. Un apport élevé en fruits, légumes et grains entiers riches en phénoliques réduit le risque de cancer, de maladies cardiovasculaires, d'inflammation chronique et de troubles métaboliques (Potì *et al.*, 2019). Les composés phénoliques naturels ou synthétiques ont montré de nombreuses activités biologiques et des avantages pour la santé pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies (Watson *et al.*, 2019).

2.2.1. Activité antioxydante

Des preuves récentes suggèrent que la consommation d'aliments riches en polyphénols peut être associée à une diminution des risques des maladies chroniques, les maladies cardiovasculaires, certains cancers et les maladies neurodégénératives, principalement par le biais de propriétés antioxydantes notamment l'élimination des radicaux libres la chélation des ions métalliques de transition, l'inhibition de l'oxydation lipidique et la régulation des enzymes liés aux stress oxydatifs (Xu *et al.*, 2017; Cory *et al.*, 2018). Les composés phénoliques possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires (**Fig. 9**). C'est pourquoi les propriétés antioxydantes des composés phénoliques sont souvent associées à leur potentiel antiradicalaire. La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup

étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante (Wang *et al.*, 2018). De nombreuses études soutiennent le fait que l'activité antioxydante des composés phénoliques est essentiellement liée à leur capacité de réduire les espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux superoxydes, hydroxyles, peroxydes, koxyles par transfert d'hydrogène selon la réaction suivante (González-Paramás *et al.*, 2018).

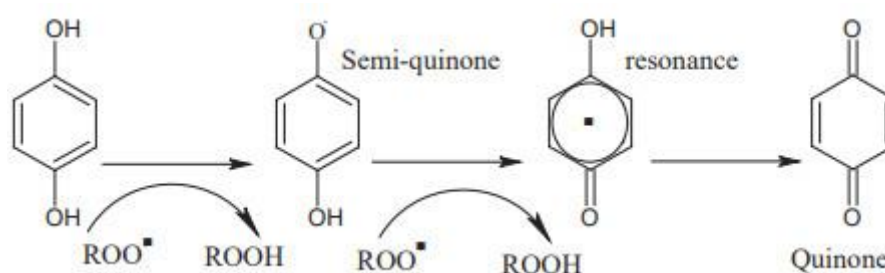


Fig. 9. Réduction des radicaux libres par les composés phénoliques (González *et al.*, 2018).

Les ions du fer (Fe^{+2}) et du cuivre (Cu^{+2}) jouent un rôle important dans la production des radicaux libres. Les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes sont considérés comme de chélateurs de ces ions métalliques (Kasprzak *et al.*, 2015), et sont alors capables d'inhiber la réaction de Fenton et ainsi la production de ERO (**Fig. 10**).

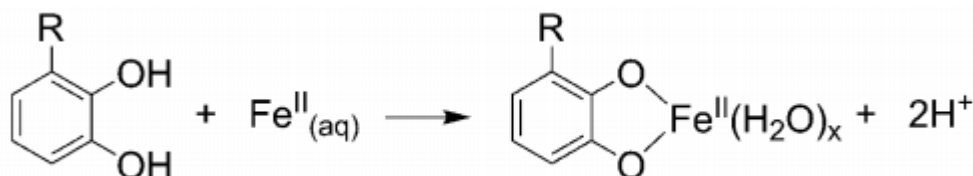


Fig. 10: Chélation des radicaux libres par les composés phénoliques (Kasprzak *et al.*, 2015).

La XO est considérée comme une source biologique importante de $\text{l'O}^{\cdot-}_2$. Les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité XO, et par conséquent, ils réduisent à la fois les concentrations d'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains. Des études ont montrées que l'extrait riche en polyphénols inhibe la forme XO de l'enzyme XOR (Belkhir *et al.*, 2017). Les flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs des lipooxygénases et des cyclooxygénases. La lutéoline, morine, galangine et catéchine sont des inhibiteurs de la CO.

Les NOS, enzymes générateurs des RNS, peuvent être inhibé par les flavonoïdes comme dans le cas de la genisteine qui inhibe la génération de NO et l'induction de iNOS (Krupkova *et al.*, 2016). Les études d'intervention humaine ont montré que les polyphénols d'olive ont diminué les niveaux de LDL oxydé dans le plasma et ont affecté positivement plusieurs biomarqueurs de dommages oxydatifs (Al-Sagheer *et al.*, 2017). En outre, les flavonoides préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés. Les polyphénols naturels peuvent également fonctionner comme des antioxydants grâce à leurs effets sur les membranes (Mahmoud *et al.*, 2019).

2.3.2. Activité anti-inflammatoire

Il existe plusieurs études montrent l'activité anti-inflammatoire des polyphénols *in vivo* et *in vitro*. Ces études ont prouvé l'idée que les polyphénols avaient la capacité de moduler la réponse immunitaire et avaient une activité anti-inflammatoire potentielle. Les polyphénols peuvent exercer des effets anti-inflammatoires par différents mécanismes, ils peuvent agir à plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire, notamment la régulation des réactions inflammatoires cellulaires dans les cellules inflammatoires (Yahfoufi *et al.*, 2018). Les mécanismes moléculaires de l'activité anti-inflammatoire des polyphénols incluent: l'inhibition des enzymes associées aux propriétés pro-inflammatoires telles que cyclooxygénase (COX), lipoxygénase (LOX) et iNOS, diminuant l'expression et/ou la fonction d'une variété de médiateurs inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion, régulation de la voie de signalisation par facteur nucléaire κ B (NF- κ B), régulation des voies de signalisation telles que celles des facteurs nucléaires et des protéines kinases et expression des gènes pro-inflammatoires (Zhang et Tsao, 2016; Hanakova *et al.*, 2017; da Cunha *et al.*, 2019).

Les polyphénols peuvent affecter les systèmes enzymatiques et de signalisation impliqués dans les processus inflammatoires, tels que la tyrosine et la sérine-thréonine protéine kinase. Ces enzymes sont connues pour être impliquées dans des processus d'activation cellulaire tels que la prolifération des lymphocytes T, l'activation des lymphocytes B ou la production de cytokines par les monocytes stimulés. La génistéine a été signalée comme un inhibiteur spécifique de la tyrosine protéine kinase. Ce dernier composé peut être impliqué dans certains des effets anti-inflammatoires, car la prolifération des lymphocytes T s'accompagne d'une phosphorylation de la tyrosine de protéines particulières (Hussain *et al.*, 2016).

Les catéchines sont les polyphénols abondants dans le thé vert. Leurs effets anti-inflammatoires sont activés par divers mécanismes différents, y compris la modulation des isoformes d'oxyde nitrique synthase (Khan et Mukhtar, 2019). Les extraits de plantes riches en polyphénols peuvent inhiber les macrophages humains sécrètent la cytokine pro-inflammatoire TNF- α et la chimiokine IL-8 de manière dose-dépendante. En même temps, les polyphénols ont amélioré le niveau de la cytokine anti-inflammatoire IL-1 β sécrétée par des macrophages traités par les lipopolysaccharides (Lama *et al.*, 2017).

Les polyphénols présentent également un effet sur les processus sécrétoires des cellules inflammatoires. En effet, des composés tels que la lutéoline, le kaempférol, l'apigénine et la quercétine ont été documentés pour représenter de puissants inhibiteurs de la β -glucuronidase et du lysozyme libéré par les neutrophiles. Ces polyphénols inhibent en outre de manière significative la libération d'acide arachidonique par les membranes cellulaires (Ginwala *et al.*, 2019).

En ce qui concerne les maladies cardiovasculaires, l'analyse a révélé que l'inflammation chronique est un facteur crucial dans son étiologie. La consommation des aliments relativement riches en polyphénols peut jouer un rôle significatif dans la réduction du risque de maladie cardiovasculaire par une amélioration de la fonction vasculaire et une modulation de l'inflammation. L'un des mécanismes anti-inflammatoires importants est

l'inhibition/moduler des enzymes génératrices d'eicosanoïdes, y compris la phospholipase A2 et la cyclooxygénase (Sung *et al.*, 2019).

Les résultats d'une étude menée auprès de 120 hommes et femmes ont suggéré qu'un apport d'extrait d'anthocyane de bleuets (300 mg par jour pendant 3 semaines) diminuait de manière significative les niveaux plasmatiques des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires liées au NF- κ B, IL-4, IL-13, IL-8 et interféron- γ [IFN- γ]). Il a également été démontré que la supplémentation en un extrait de polyphénol de raisin contenant des anthocyanes, de la quercétine, de la myricétine, du kaempférol et du resvératrol a conduit à une diminution significative dans les taux plasmatiques de TNF- α et d'IL-6 (Zhang et Tsao, 2016).

Les données disponibles démontrent l'utilité potentielle des polyphénols alimentaires pour le traitement possible des maladies inflammatoires. La surproduction de ROS mitochondriales favorise la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par l'activation du domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides. En plus de réduire l'inflammation induite par le stress oxydatif, les composés phénoliques peuvent également atténuer l'activation induite par les cytokines pro-inflammatoires de NF- κ B via différents mécanismes moléculaires (Yahfoufi *et al.*, 2018).

2.3.3. Activité antidiabétique

Une altération du métabolisme du glucose entraîne un déséquilibre physiologique avec l'apparition de l'hyperglycémie et par la suite du diabète. Il existe deux principales catégories de diabète; Type-1 et type-2. De nombreuses études rapportent les effets antidiabétiques des polyphénols. Les polyphénols peuvent affecter la glycémie par différents mécanismes, y compris l'inhibition de l'absorption du glucose dans l'intestin ou de son absorption par les tissus périphériques (Den Hartogh et Tsiani, 2019). Les polyphénols individuels, tels que la catéchine, l'épicatéchine, l'épigallocatechine, le gallate d'épicatéchine, les isoflavones, l'acide tannique, et l'acide chlorogénique diminuent également le transport intestinal médié par S-

Glut-1 du glucose (Domínguez *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2018). Une étude récente montre que la quercétine a la capacité de protéger les altérations chez les patients diabétiques pendant le stress oxydatif (Shi *et al.*, 2019).

2.3.4. Activité anticancéreuse

Le cancer est une cause majeure de décès à travers le monde. Les polyphénols pourraient jouer un rôle important contre le cancer. Les effets anticancéreux des polyphénols ont été observés à la bouche, l'estomac, le duodénum, le côlon, le foie, le poumon, la glande mammaire ou la peau (Colomer *et al.*, 2017). Beaucoup de polyphénols, comme les proanthocyanidines, les flavonoïdes, le resvératrol, les tannins, l'épigallocatechine-3-gallate, l'acide gallique et l'anthocyanine montrent des effets protecteurs dans certains modèles cancéreux de bien que leurs mécanismes d'action aient été différents (Rady *et al.*, 2018). Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'activité anticarcinogène de l'acide caféique contre un type important de cancer, l'hépatocarcinome (CHC), considéré comme ayant une incidence élevée, une très grande agressivité et une mortalité considérable dans le monde (Espíndola *et al.*, 2019). Les polyphénols naturels pourraient avoir un meilleur effet protecteur sur le cancer du sein métastatique. Les composants les plus abondants et bioactifs du thé vert, de la catéchine et épigallocatechine-3-gallate ont montré qu'ils agissaient comme des inhibiteurs de protéasome et des inducteurs de la mort de cellules tumorales (Rady *et al.*, 2018). De nombreux mécanismes d'action ont été démontrés pour l'effet chimiopréventif des polyphénols, tels que l'antiprolifération, l'antioxydation, l'activité œstrogénique/antiœstrogénique, l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose, l'induction d'enzymes de désintoxication, la régulation du système immunitaire de l'hôte et les changements dans la signalisation cellulaire (D'Abrosca *et al.*, 2017).

2.3.5. Activité antimicrobienne

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement due à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Barbieri *et al.*, 2017; Álvarez-Martínez *et al.*, 2019). Les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins ont reçu plus d'attention du à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols (Khayat *et al.*, 2018). Les flavonones ayant un groupement de sucre ont aussi montré une activité antimicrobienne, tandis que certaines flavonolignanes n'ont montré aucune activité inhibitrice envers les microorganismes (Tagousop *et al.*, 2018).

Les mécanismes responsables de la toxicité des polyphénols envers les microorganismes incluent l'inhibition enzymatique par les composés oxydés, probablement via la réaction avec les groupes sulfhydryle ou par les interactions non spécifiques avec les protéines (Farhadi *et al.*, 2019). La déstabilisation de la membrane cytoplasmique et la rendre perméable, l'inhibition des enzymes bactériennes extracellulaires, l'action directe sur le métabolisme bactérien et la privation des substrats requis pour la croissance bactérienne, spécialement les micronutriments minéraux essentiels comme le fer et le zinc (via la propriété de chélation des métaux) sont des mécanismes adaptés par les proanthocyanidines dans l'inhibition des bactéries (Rauf *et al.*, 2019).

2.4. Biodisponibilité des composés phénoliques

La biodisponibilité de polyphénols est la proportion du nutriment qui est digéré/absorbé et l'état circulant ou métabolisé par des voies normales d'un organisme vivant (Chen *et al.*, 2018).

2.4.1. Absorption

Au cours de l'absorption, les polyphénols sont conjugués dans les cellules intestinales et plus tard dans le foie par la méthylation, la sulfatation et/ou la glucuronidation (Marín *et al.*, 2015). En conséquence, les formes atteignant le sang et les tissus sont différentes de celles présentes dans les aliments et il est très difficile d'identifier tous les métabolites et d'évaluer leur activité biologique. Il est important de noter que c'est la structure chimique des polyphénols et non sa concentration qui détermine le taux et l'étendue de l'absorption et la nature des métabolites circulant dans le plasma (Figueira *et al.*, 2017). Les acides hydroxycinnamiques, lorsqu'ils sont ingérés sous forme libre, sont rapidement absorbés par l'intestin grêle (30 min) et sont conjugués comme flavonoïdes, cependant les proanthocyanidines en raison de leur nature polymère et de leur poids moléculaire élevé, leur absorption est limitée à travers la barrière intestinales (Blade *et al.*, 2016).

2.4.2. Métabolisme

Après l'absorption, les polyphénols passent à plusieurs processus de congestion. Ces procédés comprennent principalement la méthylation, la sulfatation et la glucuronidation, ce qui représente un processus de désintoxication métabolique, commun à de nombreux xénobiotiques, qui facilite leur élimination urinaire et biliaire en augmentant leur hydrophilie (Teng et Chen, 2019). La méthylation des polyphénols est également assez spécifique, elle se produit généralement en position C3 du polyphénol, mais elle pourrait se produire en position C4: en fait, une quantité notable de 4'-méthylepigallocatechine a été détectée dans le plasma humain après l'ingestion du thé. La glucuronidation se produit dans l'intestin et dans le foie, et le taux de conjugaison le plus élevé est observé en position C3 (Xiao et Hogger, 2014). Les aglycones libres sont généralement absentes ou présentes dans de faibles concentrations dans le plasma après consommation de doses nutritionnelles; Une exception sont les catéchines de thé vert, dont les aglycones peuvent constituer une proportion importante de la quantité totale dans le plasma (Sirota *et al.*, 2013). Il est important d'identifier les métabolites circulants, y

compris la nature et les positions des groupes de conjugaison sur la structure du polyphénol, car les positions peuvent affecter les propriétés biologiques des conjugués. Les métabolites de polyphénols circulent dans le sang lié aux protéines; En particulier l'albumine représente la protéine primaire responsable de la liaison. (Jaramillo, 2019). La liaison à l'albumine peut avoir des conséquences sur le taux de clairance des métabolites et pour leur délivrance aux cellules et aux tissus. Enfin, il n'est toujours pas clair si les polyphénols doivent être sous forme libre pour exercer leur activité biologique, ou les polyphénols liés à l'albumine peuvent exercer une activité biologique (Ly *et al.*, 2014). L'accumulation des polyphénols dans les tissus est la phase la plus importante du métabolisme des polyphénols car c'est la concentration qui est biologiquement active, des études ont montré que les polyphénols sont capables de pénétrer les tissus, en particulier ceux dans lesquels ils sont métabolisés comme l'intestin et le foie (Fernandes *et al.*, 2017).

L'excrétion des polyphénols avec leurs dérivés se produit par l'urine et la bile. Les métabolites largement conjugués sont plus susceptibles d'être éliminés dans la bile, alors que les petits conjugués, comme les monosulfates, sont préférentiellement excrétés dans les urines (Escudero-Lopez *et al.*, 2014).

3. Hépatotoxicité

Le foie est le plus gros organe solide du corps humain, il est situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen protégé par la cage thoracique. Il est entouré par une capsule conjonctive (la capsule de Glisson) qui s'invagine dans le parenchyme hépatique permettant de déterminer des lobes. Il a deux lobes principaux qui sont constitués de minuscules lobules (Obert *et al.*, 2015). De point de vue histologique, le foie est constitué de cellules hépatiques (hépatocytes) organisées en travées autour des sinusoides. L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique (une structure hexagonale). Le lobule hépatique est entouré d'espaces portes, où sont groupées les branches de l'artère hépatique, de la veine porte et des canaux biliaires. Le sang circule à travers les hépatocytes des espaces portes vers les veines centro-lobulaires. A l'inverse, les canalicules biliaires sont constitués de sillons ménagés entre les faces accolées d'hépatocytes adjacents (**Fig. 11**). Ses échanges avec le reste du corps se font pour la plupart à travers sa double irrigation sanguine (veine porte et artère hépatique), qui se termine par une multitude de capillaires jusqu'à l'intérieur du foie. 80 % des cellules du foie sont des hépatocytes le reste sont les lymphocytes hépatocytaires, cellules biliaires et endothéliales, cellules de *Küppfer*, cellules *Ito* (Lowe *et al.*, 2018).

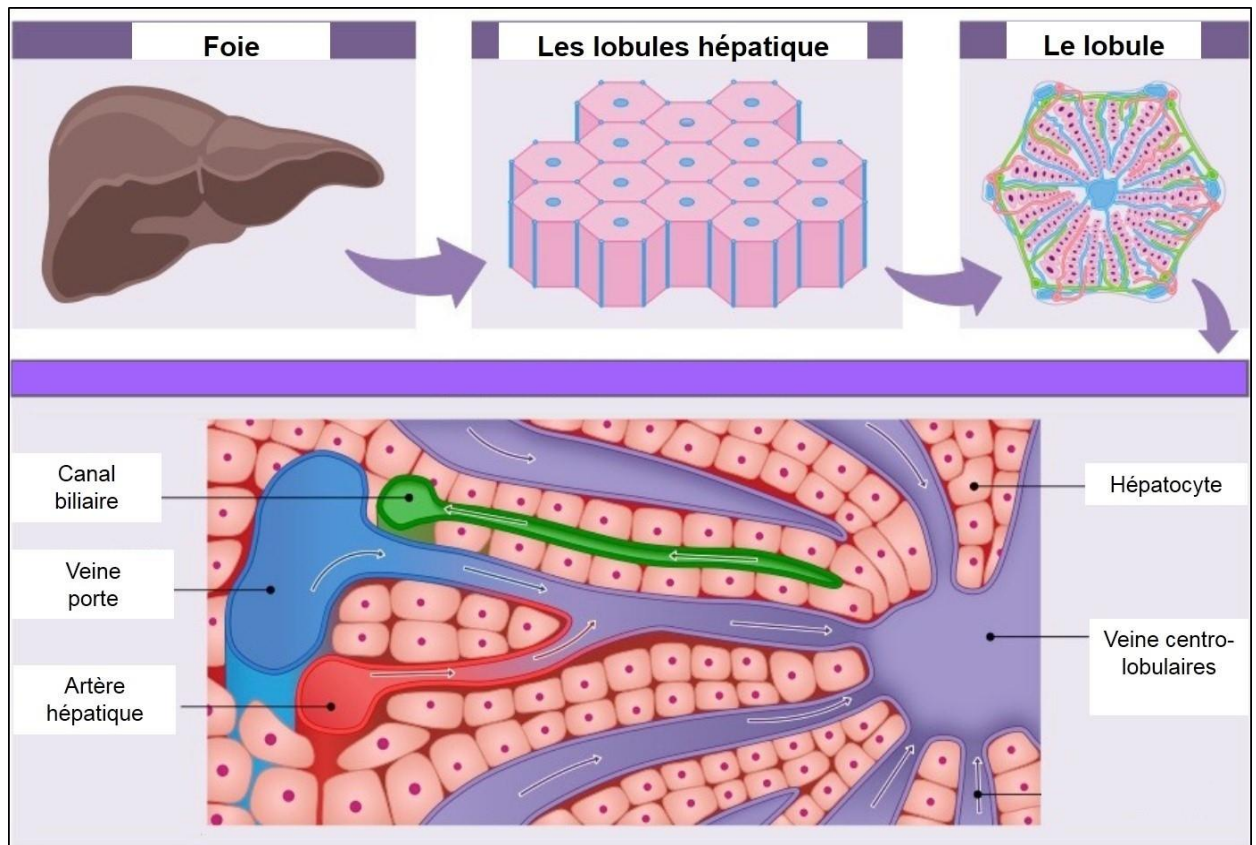


Fig. 11: Organisation structurale et histologique du foie (Lowe *et al.*, 2018).

Le foie effectue de nombreuses fonctions vitales de stockage et de métabolismes, il est interposé entre les apports nutritionnels et la circulation générale. Environ 90% des nutriments du corps passant par le foie en provenance des intestins, le foie convertit les aliments en énergie, emmagasine les nutriments et produits des protéines sanguines. Le foie agit également comme filtre pour éliminer les agents pathogènes et les toxines du sang (Lowe *et al.*, 2018). Le foie participe à un immense trafic biochimique, à la fois synthétique et catabolique, qui va du métabolisme des carbohydrates à la synthèse des protéines y compris les enzymes, les hormones, les facteurs de coagulation et les facteurs immunitaires, les enzymes du foie appelées transaminases ou aminotransférases. Les facteurs de coagulation, en passant par le métabolisme lipidique et la dégradation de l'hème et de nombreux xénobiotiques. Le foie possède aussi une fonction exocrine assurant l'élimination de produits de déchets via un réseau de canalicules biliaires qui se déverse dans le duodénum (Tripodi, 2015).

La détoxification en générale est assurée par des mécanismes en deux phases (**Fig. 12**). Dans la plupart des cas, des enzymes de phase I commencent le processus de détoxification en transformant chimiquement les composés solubles lipidiques en composés solubles dans l'eau en préparation pour la détoxification de la phase II appelée la phase de conjugaison, Les conjugués en général sont plus hydrosolubles donc facilement excrétables que la substance mère. Elles englobent des réactions de glucuroconjugaison, sulfoconjugaison, méthylation, acétylation et conjugaison au glutathion (Fortney *et al.*, 2017).

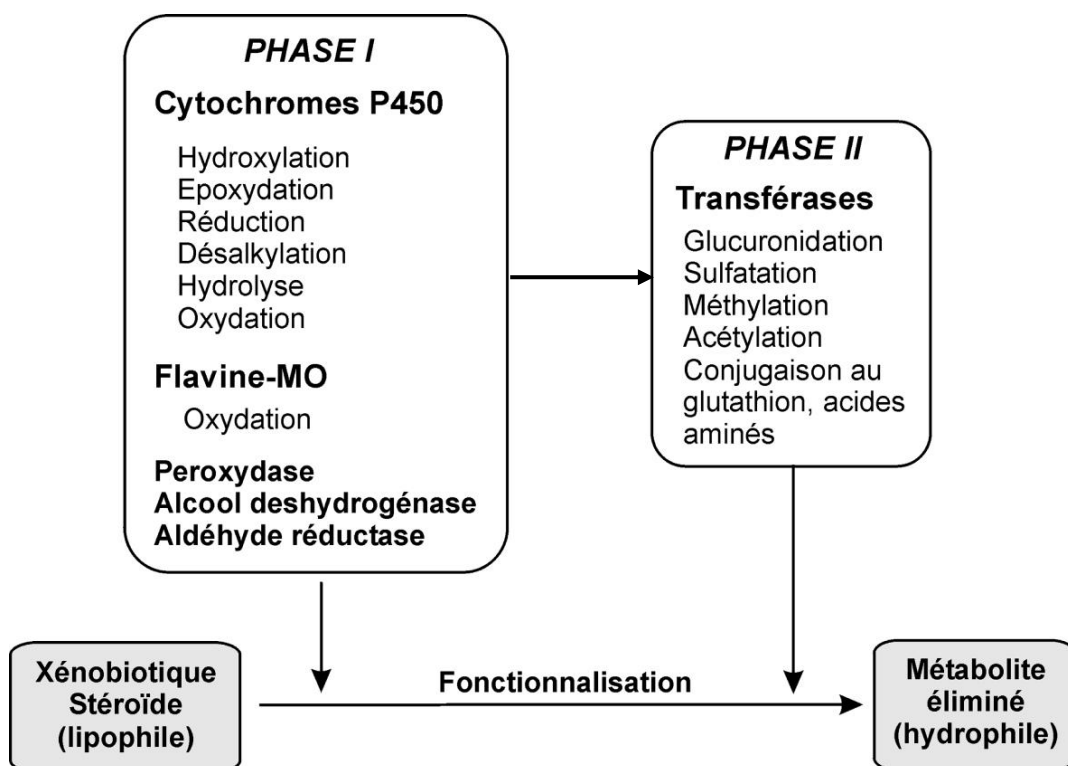


Fig. 12: Phases de détoxification des xénobiotiques (Fortney *et al.*, 2017).

En raison de sa relation avec le tractus gastro-intestinal et son rôle important dans la plupart des processus métaboliques, le foie est une cible importante de la toxicité des médicaments, des xénobiotiques et du stress oxydatif (Louvet et Mathurin, 2015).

3.2. Hépatotoxicité médicamenteuse

Plus de 1200 médicaments sont actuellement répertoriés comme potentiellement hépatotoxiques. Les pathologies hépatiques d'origine médicamenteuse sont fréquentes, dans

la gamme pharmacologique, les antibiotiques et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (Fortney *et al.*, 2017). Un groupe d'enzymes situé dans le réticulum endoplasmique, connu sous le nom de cytochrome P450 (CYP450), est la plus importante famille d'enzymes métabolisantes dans le foie. Le cytochrome P450 est le composant oxydase terminal d'une chaîne de transport d'électrons. Ce n'est pas une seule enzyme, mais plutôt une famille étroitement apparentée de 50 isoformes; six d'entre eux métabolisent 90% des xénobiotiques (Louvet et Mathurin, 2015). La toxicité est le plus souvent due à la transformation des médicaments en des métabolites réactifs toxiques (principalement par les CYP450 hépatiques). Ces métabolites réactifs sont détoxifiés par différents systèmes de protection, comme la conjugaison au glutathion et les époxydes hydrolases (Satapathy *et al.*, 2015). Lorsque ces mécanismes sont insuffisants, les métabolites réactifs peuvent se lier de façon covalente sur des constituants des hépatocytes et entraîner la mort cellulaire en interférant avec l'homéostasie cellulaire ou en déclenchant des réactions immunitaires. Différents mécanismes peuvent s'associer pour un même médicament. Dans la toxicité de l'acétaminophène, l'oxyde nitrique (NO) récupère le superoxyde pour produire du peroxynitrite, qui provoque alors la nitration des protéines et des lésions tissulaires (Muriel *et al.*, 2017).

3.3. Hépatotoxicité des produits chimiques

Les produits chimiques sont responsables également d'atteintes hépatiques très variées en passant par différentes voies d'exposition (inhalation, ingestion, passage percutané). De plus, les effets à long terme à des expositions intermittentes à doses variables, susceptibles de produire des maladies chroniques du foie et des cancers (Gupta, 2018). L'exposition par inhalation expose à un risque toxique plus grand que par ingestion puisque l'agent chimique va éviter une partie de la détoxification de la voie trans-hépatique (Bhakuni *et al.*, 2016). Les mécanismes de toxicité des agents chimique sont similaires à ceux des médicaments classiques avec la formation de métabolites réactifs, de radicaux libres entraînant différentes

lésions cellulaires. Les agents chimiques référencés comme potentiellement toxiques pour le foie, sont surtout le tétrachlorure de carbone, le tétrachloéthane, le trichloroéthylène et le chlorure de vinyle (McGill et Jaeschke, 2019).

3.4. Evaluation de l'hépatotoxicité

Les maladies du foie se caractérisent par la perturbation ou la perte d'un bon nombre de ses fonctions. Les méthodes d'évaluation de la fonction hépatique incluent des méthodes dites d'exploration biologique qui se résument en un ensemble de tests biochimiques, encore appelé «bilan biologique hépatique», l'exploration biologique hépatique comporte un nombre pléthorique d'examen. Ces examens servent à diagnostiquer les pathologies hépatiques même asymptomatiques, et à apprécier de l'efficacité d'un traitement apporté (Md Sani *et al.*, 2017). Les transaminases (ou aminotransférases) sont les enzymes hépatocytaires utilisées dans l'évaluation de la fonction hépatique. Dont la fonction est de catalyser des réactions de transfert d'un groupe amine d'un acide alpha-aminé à un acide alpha-cétonique. L'alanine aminotransférase (ALT), appelé également Sérum Glutamyl- Pyruvate transaminase (SGPT) et l'aspartate aminotransférases (AST), appelé également Glutamooxaloacétate Transférase (SGOT) sont des transaminases participent à la néoglucogénèse en catalysant le transfert de groupes aminés de l'alanine ou de l'acide aspartique à l'acide ceto-glutarique afin de produire de l'acide pyruvique et de l'acide oxalo-acétique. Une augmentation de l'activité de ces enzymes est due à une libération à partir de cellules hépatiques endommagées (Ramachandran et Jaeschke, 2019).

Les phosphatases alcalines (PAL) sont des hydrolases qui clivent une liaison phosphoester en libérant un groupe hydroxyle et un phosphate. Les phosphatases alcalines sont localisées dans les membranes de cellules situées dans le foie, les os, l'intestin, le placenta, les reins et les globules blancs circulant dans le sang. 90 % des phosphatases alcalines sont d'origine hépatique et osseuse. Leur activité est dépendante d'ions métalliques (surtout Mg^{+2} et Zn^{+2}).

Une augmentation de l'activité PAL sérique est observée au cours de toutes les maladies du foie, mais en particulier et de manière prononcée au cours des maladies cholestatiques qu'elles soient intrahépatiques ou extrahépatiques (calculs, tumeurs) (Holstege, 2016).

Les gamma-glutamyl transpeptidases (γ GT) sont des enzymes hépatiques impliquées dans le métabolisme des acides aminés. On les trouve aussi dans d'autres tissus, notamment le rein le pancréas, ou encore dans l'épididyme. La détermination de l'activité sérique des γ GT est un indice d'anomalie du foie, le plus souvent dû à un alcoolisme chronique (spécificité à 80 %); les gamma GT sont un marqueur d'absorption d'alcool dans le mois ayant précédé la prise de sang, une cirrhose hépatique, une nécrose hépatique, des tumeurs ou cancers hépatiques, ou hépatotoxicité médicamenteuse (Lonardo et Romagnoli, 2016).

La bilirubine totale est un pigment qui provient de la dégradation de l'hémoglobine présente physiologiquement dans le plasma sous forme non conjuguée (environ 95%) ; dans la mesure où elle est liée aux protéines, elle n'est pas filtrée par les glomérules rénaux. Hyperbilirubinémie reflète une augmentation de la concentration plasmatique en bilirubine conjuguée, ceci peut être le signe d'un ictère, affections hépatiques, anémie et insuffisance cardiaque (Memon *et al.*, 2016).

3.5. Hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone

Le tétrachlorure de carbone (CCl_4), également connu sous le nom de tétrachlorométhane, est un composé organique de la formule chimique (CCl_4) largement connu comme un précurseur de fluides frigorigènes, comme un insecticide dans la lutte contre les insectes (Halon-104) et comme agent de nettoyage.

Le CCl_4 est un liquide incolore, d'une odeur douce qui peut être détectée à de faibles niveaux et qui n'a pratiquement aucune inflammabilité à des températures plus basses. Le CCl_4 est non-polaire, en tant que solvant, il est bien adapté à la dissolution d'autres composés non polaires, les graisses et les huiles (Vulimiri *et al.*, 2017).

Le CCl₄ est un produit toxique par inhalation, et peut provoquer des céphalées, vomissements, pertes de connaissance, arrêts respiratoires ou encore des douleurs abdominales avec diarrhées sanglantes, lésions du foie et des reins. Le tétrachlorure de carbone est une substance hépatotoxique largement utilisé dans la recherche scientifique afin d'évaluer les agents hépatoprotecteur dans les expériences *in-vivo* (Scholten *et al.*, 2015; Bhakuni *et al.*, 2016).

Chez les humains, le CCl₄ peut provoquer une dégénérescence graisseuse centrilobulaire, une nécrose des hépatocytes et même insuffisance hépatique à fortes doses. Chez les rats et les souris, le tétrachlorure de carbone provoque des carcinomes hépatocellulaires et des phéochromocytomes. Le tétrachlorure de carbone a des effets modérément irritants sur la peau et les muqueuses (McKee *et al.*, 2015). La biotransformation du tétrachlorure de carbone au niveau des hépatocytes donne des radicaux trichlorométhyle (CCl₃•) et trichlorométhylperoxy (CCl₃OO•), ces radicaux peuvent se lier à des macromolécules cellulaires telles que des protéines et lipides. Le principal responsable de la peroxydation lipidique est le radical trichlorométhylperoxy (Muriel *et al.*, 2017), (**Fig. 13**). La réduction de tétrachlorure de carbone peut conduire à une inactivation irréversible de l'enzyme du CYP450 par la perte subséquente du groupe prothétique de l'hème. L'inactivation du système enzymatique du CYP450 est prouvée que le "suicide" déclenchée par les radicaux formés dans le métabolisme du tétrachlorure de carbone (Muriel *et al.*, 2017).

Le tétrachlorure de carbone lui-même et les radicaux formés à partir de lui sont considérés comme responsables pour la cytotoxicité accrue dans les cellules hépatiques, car ils inhibent la Ca⁺²/Mg⁺²-ATPase dans le réticulum endoplasmique, ce qui entraîne une diminution marquée de la concentration de calcium dans les microsomes et en même temps à une augmentation de 100 fois du calcium dans cytosol (Muriel *et al.*, 2017). Après l'administration d'une ou de trois doses intrapéritonéales consécutives de tétrachlorure de carbone (2 ml/kg) de poids corporel des rats, le taux d'acide lactique dans le sang a augmenté avant que les animaux ne puissent développer une cirrhose du foie (Takahashi et Fukusato, 2017).

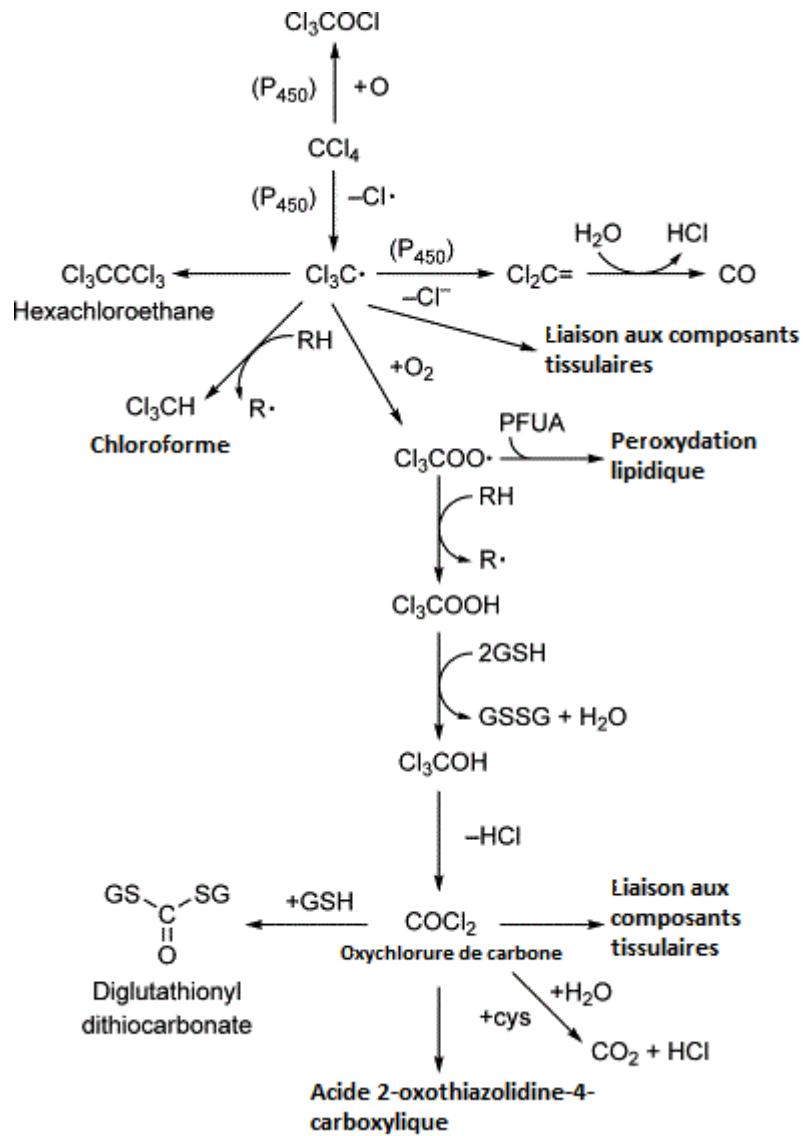


Fig. 13 : Différents radicaux libres dérivés de CCl_4 (Mehendale, 2010).

4. *Thymus pallidus*

4.1. Généralités

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Une plante médicinale est définie comme une plante présentant des propriétés thérapeutiques, utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux, sans avoir des effets secondaires ou toxique à dose normale (Srivastava, 2018). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales (Reid *et al.*, 2018). Elles représentent un réservoir immense de composés bioactives, ces composés bioactifs ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie.

Les Lamiaceas ou labiatae est la famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 6000 espèces et près de 210 genres. Le thym ou thymus est un genre de la famille Lamiaceas comporte plus de 300 espèces. En Algérie, le genre *Thymus* est représenté par 12 espèces qui sont: *Thymus fontanesii*, *Thymus commutatus* Ball., *Thymus dreatensis*, *Thymus numidicus*, *Thymus guyonii*, *Thymus lanceolatus*, *Thymus pallidus*, *Thymus glandulosus*, *Thymus hirtus*, *Thymus algeriensis*, *Thymus ciliatus*, et *Thymus capitatus* L. (Quezel et Santa, 1963).

4.2. *Thymus pallidus*

Thymus pallidus est une espèce spontanée, vivace, appartient à la famille Lamiacée, elle répan due dans le sud de l'Europe et le nord d'Afrique. En Algérie, *T. pallidus* est connue sous le nom de « Khyata » en Arab (dans la région de BBA et Sétif), «Azoukenni» en Tamazight et «Thym» en Farçais. Le nom thym proviendrait aussi bien du latin que du grec *Thymus* qui signifie parfumé (Quezel et Santa, 1963).

4.2.1. Aspect botanique

La *Thymus pallidus* est un sous-arbrisseau très décoratif et très aromatique de 20 à 50 cm de hauteur, possède de très nombreuses tiges ligneuses très ramifiées qui se développent en touffes denses (**Fig. 14**). Les feuilles florales sensiblement identiques aux feuilles caulinaires parfois dilatées à la base, mais rétrécies au sommet, aiguës, révolutes à la base. Fleurs roses ou violet pourprés et la floraison se produit dans le mois de Mars/Avril. La plante est hermaphrodite à reproduction autonome, est originaire de la Méditerranée (le Sud d'Europe et le Nord d'Afrique) (Quezel et Santa, 1963).



Fig. 14: Aspect botanique de la plante *T. pallidus* (photo prise par l'auteur, Mai 2013).

4.2.2. Taxonomie

La taxonomie des plantes de la *T. pallidus* selon (Quezel et Santa, 1963).

Règne :	Plantes.
Sous règne :	Plantes vasculaires.
Embranchement :	Spermaphytes
Sous embranchement :	Angiospermes.
Classe :	Dicotylédones
Sous classe :	Dialypétales
Ordre :	Labiales
Famille :	Lamiaceae.
Genre :	Thymus
Espèce :	<i>Thymus pallidus</i>

4.2.3. Utilisation traditionnelle

T. pallidus est largement utilisée comme aliment et dans la médecine populaire d'Algérie pour le traitement de certaines maladies inflammatoires, la gastro-entérite, les spasmes, les coliques et les maux d'estomac. En infusion, les fleurs et les feuilles sont utilisées comme vermifuges pour les enfants et pour traiter la mauvaise digestion ainsi que les problèmes menstruels et respiratoires (Ouhaddou *et al.*, 2014).

4.2.4. Composition chimique

Plusieurs espèces de *Thymus* ont été investiguées. Il paraît que les composés phytochimiques les plus répandus dans différentes espèces de ce genre ayant des activités pharmacologiques sont les huiles essentielles (Asdadi, 2014; Msaada *et al.*, 2016). L'étude phytochimique de la plante de *T. pallidus* réalisée par Warda *et al.* (2009) a révélé la présence de diverses molécules (Tableau 2).

Tableau 02 : Estimation phytochimique de *T. pallidus* (Warda *et al.*, 2009)

Composés	Estimation phytochimique
Anthocyanes	-
Leuco-anthocyanes	-
Flavonoïdes	+
Terpènes stérols	+++
Tannins Gallique	-
Tannins Catéchine	+++
Saponines	-
Alcaloïdes	-
Quinones	-

+: présent; +++: présent à haut quantité; - : absence.

Matériel

&

Méthodes

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Thymus pallidus Coss. a été collecté au niveau de la région de Khelil (Chefaa), Wilaya du Bordj Bou Arreridj au mois de Mai 2013. Elle a été identifiée par Pr. Bachir OUDJHIH, Département des sciences agronomiques, Faculté des sciences, Université Hadj-Lakhdar, Batna.

1.2. Animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris mâles et femelles, *Swiss albinos* âgées de 2 mois dont le poids varie entre 25 et 30 g, procurés auprès de l'Institut Pasteur d'Algérie. Ces souris sont utilisées après une période d'adaptation de 7 jours, elles ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia.

1.2. Réactifs et produits chimiques

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont: Le méthanol, l'hexane, l'acétate d'éthyle, le chloroforme, Quercitine, Trichlorure d'aluminium (AlCl_3), Carbonate de sodium (NaCO_3), Folin-Ciocalteu, Acide gallique, Acide trichloracétique (TCA), Acide thiobarbiturique (TBA), Ferricyanide de potassium (K_3FeCN_6), Chlorure ferreux (FeCl_3), 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Butylhydroxytoluène (BHT), β -carotène, Phosphate de sodium (NaHPO_4), Acide ascorbique (Vit. C), Acide linoléique, Chlorure d'hydrogène (HCl), 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) (ABTS), Persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), Chlorure de potassium (KCl), 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridine) (DTNP), Xanthine, Allopurinol, Ethylène diamine tétra acétique (EDTA) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les réactifs et les produits chimiques sont provenus de Sigma, Sigma-Aldrich et Fluka.

2. Méthodes

2.1. Extraction

L'extraction des composés phénoliques de *T. pallidus* a été effectuée selon la méthode décrite par Markham (1982). Brièvement, 100 g de la partie aérienne (tige et feuilles) de la plante sont mise à macérer dans 1L de méthanol (85%), sous agitation douce pendant cinq jours à température ambiante. Le mélange par la suite a été filtré sur un papier filtre et le filtrat est soumis à une évaporation rotative à 40°C dans un rota-vapeur (BÜCHI) pour éliminer le méthanol. La solution obtenue est séchée à l'étuve afin d'obtenir une poudre de couleur brun foncé qui représente l'extrait brut (E.Br).

Le fractionnement successif de l'extrait brut a été réalisé par des solvants à polarité croissante. L'extrait brut est initialement mélangé avec l'hexane (V/V, 3 fois), le mélange est laissé décanter, et la phase organique supérieure est récupérée. L'extraction est refaite plusieurs fois jusqu'à ce que le solvant (hexane) devienne transparent. L'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane (E.Hex). La phase aqueuse résiduelle est soumise à une autre extraction par le chloroforme pour obtenir fraction de chloroforme (E.Ch), et enfin par l'acétate d'éthyle en suivant les mêmes étapes que la première extraction par l'hexane, dont la fraction est l'extrait d'acétate d'éthyle (E.EtA). La phase aqueuse résiduelle est considérée comme l'extrait aqueux (E.Aq). Les extraits sont conservés à 4°C jusqu'à l'utilisation.

2.2. Caractérisation phytochimique

2.2.1. Dosage des polyphénols et flavonoïdes

La teneur en composés phénoliques des différents extraits est estimée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Belkhir *et al.*, 2017). En effet, 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à 200 µl d'extrait ou standard avec des dilutions convenables. Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (7.5%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2

h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm. La teneur en polyphénols totaux est estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160 µg/ml) et est exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

La méthode du trichlorure d'aluminium (Baghiani *et al.*, 2010) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits. La méthode consistait à ajouter 1 ml d'extrait ou standard à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40 µg/ml) et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

2.2.2. Analyses des extraits par HPLC-DAD-ESI-MS/MS

L'extrait brut, d'acétate d'éthyle ainsi que la fraction aqueuse de *T. pallidus* sont analysés par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectrophotomètre de masse (HPLC-DAD-ESI-MS/MS: High performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray ionization tandem mass spectrometry) pour identifier les principaux composés par comparaison avec la littérature et certaines normes de référence (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2015). Le système HPLC-DAD utilisé de marque Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon) constitué d'une pompe LC-20AT, d'un détecteur de matrice de diodes UV SPD-M20A et d'un four à colonnes CTO-20AC. Une colonne Multo High 100 RP 18-5µ (250x4.6 mm) (CS-Chromatographie Service GmbH-Allemagne) a été utilisée. Les conditions de HPLC comprenaient un système de solvants à gradient linéaire à 25°C, consistant en deux systèmes de solvants: 1% d'acide formique dans l'eau (A) et de l'acétonitrile comme suit: 90% à 85% A en 15 minutes, maintenu à 20 min et changeant à 82% A de 20 à 25 min, 82 à 70% A de 25 à 50 min, maintenu à 70% A de 50 à 80 min et à 90% A de 80,01 à 90 min. Le débit était de 0,5 mL/min et le volume injecté était de 20 µL. Les spectres UV des chromatogrammes ont été

enregistrés de 200 à 600 nm pour la caractérisation de pointe. Les analyses HPLC-ESI-MS/MS ont été enregistrées à l'aide d'un système de chromatographie liquide Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., CA, USA) connecté par une scission à un système Esquire 4000 Ion Trap LC/MSⁿ (BrukerDaltoniks, Allemagne). L'ionisation a été effectuée à 3000 V assisté par de l'azote comme gaz nébulisant à 50 *psi* et comme gaz de séchage à 365°C, avec un débit de 10 L/min. Les ions négatifs ont été détectés en utilisant un balayage complet (*m/z* 20-2000). Les paramètres du piège ont été définis dans le contrôle des changements d'ions (ICC) en utilisant les paramètres par défaut du fabricant et un temps d'accumulation maximum de 200 ms. Le même système de colonne et de solvant utilisé dans la chromatographie HPLC-DAD a été utilisé.

2.3. Etude de l'activité antioxydante *in vitro*

2.3.1. Inhibition de la xanthine oxydase

L'enzyme de la xanthine oxydase (XO) a été purifiée à partir de lait de vache. L'effet inhibiteur des extraits de *T. pallidus* sur l'activité de la xanthine oxydase (XO) a été déterminé spectrophotométriquement par le suivie de la quantité d'acide urique produit par oxydation de 100 µM de xanthine en présence de plusieurs concentrations de chaque extrait de *T. pallidus* (Belkhiri *et al.*, 2017). L'absorbance a été lue à 295 nm, et l'activité inhibitrice de ces extraits a été comparée par rapport au standard allopurinol qui est l'inhibiteur spécifique de la XO. Après ajout de la XO, la réaction a été suivie pendant 60 secondes et l'activité inhibitrice des extraits a été exprimée en dpourcentage d'inhibition (I %) calculé ainsi: $I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$

A_C : absorbance en absence de l'extrait (contrôle négatif)

A_E : absorbance en présence de l'extrait

L'IC₅₀ de chaque extrait (concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique) testé est déterminée.

2.3.2. Test d'ABTS^{•+}

L'activité anti-radicalaire de l'ABTS des extraits est mesurée par la méthode (Abu *et al.*, 2017). Une solution d'ABTS (7 mM) est préparée en mélangeant 72 mg d'ABTS avec 13,24 mg de persulfate de potassium (2,45 mM) dans 20 ml d'eau distillée et laissée incuber pendant 16 h à l'obscurité. La solution d'ABTS^{•+} (7 mM) est diluée avec l'éthanol (80%) jusqu'à atteindre une absorbance de $0,7 \pm 0,002$ à 734 nm. 1,9 ml de cette solution sont ajoutés à 100 µl de solution d'extrait à différentes concentrations. Après incubation pendant 30 min et à température ambiante l'absorbance est mesurée à 734 nm. Le témoin est préparé en remplaçant la solution d'extrait par l'eau distillée. L'acide ascorbique et le BHT ainsi que la quercétine sont utilisés comme standard à différentes concentrations. Le pourcentage de l'activité antiradicalaire de l'ABTS^{•+} de chaque extrait est calculé comme suit :

$$\text{L'activité anti-radicalaire vis-à-vis l'ABTS}^{\bullet+} (\%) = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Où A_C : absorbance du contrôle (sans extrait)

A_E : absorbance en présence de l'extrait

L'activité antiradicalaire des extraits *vis-à-vis* le radical ABTS est exprimée en concentration effectrice (EC_{50}), c'est la concentration d'extrait qui donne 50% d'activité.

2.3.3. Test d'hémolyse

La résistance des érythrocytes prétraités par les extraits contre l'attaque radicalaire est évaluée selon le protocole décrit par Bonamigo et ses collaborateurs (2017). L'attaque radicalaire est induite par l'addition de l'AAPH [2,2'-azo-bis (2-amidinopropane)-HCl] (50 mM). Le sang de souris est collecté dans un tube hépariné, puis dilué dans un tampon phosphate (300 mOsm, pH 7.4) pour obtenir un hémocrite de 2%. Brièvement, 136 µl d'AAPH sont ajoutés à 80 µl de suspension d'érythrocytaire et 20 µl d'extrait (0.1 mg/ml). La cinétique de disparition progressive des hématies est suivie par la mesure dynamique de la diminution de l'absorbance à 620 nm (par un lecteur de plaque 96 puits) pendant 4 heures d'incubation avec l'AAPH à

37°C. La quercétine et la vitamine C sont utilisées comme standards. La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes HT₅₀ (Half-hemolysis Time).

2.3.4. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice des extraits est mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine, à différentes concentrations, selon la méthode de Ademiluyi *et al.* (2018). Les solutions d'échantillons (500 µl) sont initialement mélangées avec 100 µl FeCl₂ (0.6 mM dans l'eau distillée) et 900 µl de méthanol. Après 5 min, 100 µl de Ferrozine (5 mM dans le méthanol) sont additionnés au milieu réactionnel, le mélange est bien agité puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la formation de complexe avec une couleur violet (Fe (II)-Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Par ailleurs, le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol. L'EDTA est utilisé comme chélateur de référence à un intervalle de concentration de (0-40 µg/ml). L'effet séquestrant des échantillons vis-à-vis du fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante:

$$\text{Pourcentage de chélation (\%)} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Où A_C : absorbance du contrôle (sans extrait)

A_E : absorbance en présence de l'extrait

L'activité chélatrice des extraits a été évaluée en utilisant EDTA comme standard et les résultats ont été exprimés en µg EDTA équivalent/mg extrait.

2.3.5. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits est déterminé par la méthode de (Maazoun *et al.*, 2018). 400 µl de différentes concentrations d'extraits ou de l'antioxydant standard sont mélangées avec 400 µl de tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6) et 400 µl de ferricyanide de potassium

[K₃Fe(CN)₆] (1%). Après une incubation à 50°C pendant 20 min et l'ajoute de 400 µl de TCA (10%), le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. Ensuite, 400 µl de surnageant ont ajoutée à 400 µl d'eau distillée et 80 µl de FeCl₃ (0,1%) l'absorbance est lue à 700 nm après une incubation pendant 10 mn. Les résultats sont exprimés en µg acide ascorbique équivalent/mg d'extrait.

2.3.6. Piégeage du peroxyde d'hydrogène

La capacité des extraits à piéger le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été réalisée selon la méthode de Perera *et al.* (2016). 0,6 ml de H₂O₂ (40 mM) sont préparés dans un tampon phosphate (50 mM, pH=7,4) et ajouté à 3,4 ml de l'extrait (solubilisés dans le tampon phosphate). La concentration de peroxyde d'hydrogène est déterminée par spectrophotométrie, à 230 nm après une incubation pendant 2 min. Le pourcentage de piégeage du peroxyde d'hydrogène est calculé comme suit :

$$\text{Le pourcentage de piégeage de H}_2\text{O}_2 (\%) = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Ou A_C: absorbance de contrôle (sans extrait)

A_E: absorbance en présence de l'extrait

L'activité de piégeage de H₂O₂ par les extraites est exprimés en concentration effectrice (EC₅₀), c'est la concentration requise pour obtenir un effet de 50% (EC₅₀) de piégeage peroxyde d'hydrogène.

2.3.7. Inhibition de la peroxydation lipidique par le test de β-carotène

La capacité antioxydante des extraits a été déterminé par le test de β-carotène en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de β-carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique a été réalisée selon la méthode décrite par Delfanian et ses collaborateurs (2018). Une solution de β-carotène/acide linoléique a été préparée comme suit: premièrement, 0.5 mg de β-carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme, ensuite 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont ajoutés. Le chloroforme a été évaporé à 40 °C

dans le rotavapor. 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutées au mélange avec agitation vigoureuse. Le mélange réactionnel a été par la suite aliquoté (2.5 ml) dans des tubes à essai, et 350 µl de chacun des extraits (2 mg/ml, dans l'eau distillée ou dans le méthanol) ont été ajoutés. La même procédure a été répétée avec le BHT (2 mg/ml) comme un contrôle positif et avec le méthanol et l'eau distillée comme des contrôles négatifs. Les absorbances ont été lues à 490 nm, après 1 heure, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24h et 48 h d'incubation à température ambiante à l'obscurité. L'activité antioxydante (AA %) a été calculé ainsi: $AA \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$

Où A_C : absorbance du contrôle (sans extrait)

A_E : absorbance en présence de l'extrait

2.3.8. Test de DPPH

L'activité anti-radicalaire des différents extraits de *T. pallidus* est déterminée en utilisant le DPPH comme un radical libre relativement stable selon le protocole décrit par Moldovan et ses collaborateurs (2017). Le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette vire au jaune en présence de capteurs des radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine. Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. Un volume de 50 µl des solutions d'extraits ou standards (quercétine, rutine, BHT) est ajouté à 1250 µl DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\text{L'activité antiradicalaire vis-à-vis DPPH (\%)} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Où A_C : absorbance de contrôle négatif (sans extrait)

A_E : absorbance en présence de l'extrait

L'activité antiradicalaire des extraites *vis-à-vis* le radical DPPH est exprimés en concentration effectrice (EC_{50}), c'est la concentration d'extrait qui donne 50% d'activité.

2.4. Etude de la toxicité

Afin d'éviter tout éventuel risque de toxicité lors des activités biologiques, il était nécessaire de réaliser des essais de toxicité afin de choisir la dose thérapeutique non toxique (Hasan *et al.*, 2018). Pour cela, la toxicité orale subaiguë d'E.Br et E.EtA a été évaluée chez les souris selon la méthode de Chauhana et Singh, (2012). Des souris femelles *Swiss albinos* (22-25 g) ont été répartis au hasard en groupes de huit animaux ayant chacun un poids corporel moyen similaire. Les animaux ont été traités avec des doses croissantes de l'extrait : 50, 200, 500, 1000 et 2000 mg/kg pour chaque extrait, tandis que le groupe témoin a reçu NaCl (0.9%). L'administration quotidienne des extraits par voie orale (gavage) a été réalisée pendant 21 jours. Par la suite, les animaux ont été observés de près pour les 4 premières heures et après chaque 24 h jusqu'à 21 jours pour tous les symptômes possibles sont observés, ainsi que le nombre de morts au bout du temps imparti et des manifestations toxiques telles que l'augmentation de l'activité des locomotrice, palpitation diminution/augmentation de la fréquence respiratoire, halètement, salivation, cloniques, convulsion, l'agressivité, le coma et la mortalité (décès).

Après 21 jours, seulement les animaux traités par la dose de 2000 mg/kg sont sacrifiés et le sang a été obtenu par ponction cardiaque et collecté dans des tubes contenant l'EDTA. Ensuite, les tubes sont centrifugés à 3000 g/15 min à 4°C et le sérum a été analysé pour différents paramètres biochimiques tels que : L'alanine aminotransférase (ALT), l'aspartate aminotransférase (AST), la phosphatase alcaline (ALP), cholestérol total (Chol. T), triglycérides (TG), urée (Ur), glycémie (Gly), créatinine (cérat), bilirubine totale (BT).

2.5. Etude *in vivo* de l'activité antioxydante des extraits

L'activité antioxydante *in vivo* des extraits a été évaluée selon la méthode de Baghiani *et al.*, (2013), sur des souris mâles, *Swiss albinos*, adultes de poids variant entre 25 et 30 g, qui

sont répartis selon l'homogénéité de leurs poids en plusieurs lots expérimentaux de 8 animaux chacun comme suite :

- **Groupe I:** Groupe témoin (contrôle négative) a reçu NaCl (0.9%) seulement.
- **Groupe II:** Groupe contrôle positive, a reçu une dose de 300 mg/kg de Vit. C.
- **Groupe III:** Groupe d'E.Br, a reçu une dose de 500 mg/kg de d'E.Br.
- **Groupe IV:** Groupe d'E.EtA, a reçu une dose de 500 mg/kg de d'E.EtA.

L'administration quotidienne par voie orale (gavage) de Vit. C et les extraits est procédés pendant 21 jours. A la fin de la période du traitement, les animaux sont sacrifiés par décapitation cervicale, le sang prélevé et collecté dans des tubes secs, puis a été centrifugé à 3000 g/15 min à 4°C. Le plasma testé pour leur activité antioxydante du plasma a été évalué par le test de DPPH et le pouvoir réducteur.

Après la dissection, le foie, le cerveau et les reins de chaque souris sont rapidement prélevés et bien rincés avec l'eau physiologique froide puis séchés sur le papier filtre. Ensuite, chaque organe a été coupé en petits morceaux, pesé et enfin homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce dans une solution de KCl (1.15%) à 10% (p/v). L'homogénat obtenu est centrifugé à 4000 tours/min pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires.

2.5.1. La capacité antioxydante totale du sang

Le potentiel de défense antioxydant des globules rouges est mesuré selon le protocole décrit par Bonamigo et ses collaborateurs (2017). Brièvement, 136 µl d'AAPH (50 mM) sont ajoutés à 80 µl de suspension d'érythrocytaire (4%). La cinétique de disparition progressive des hématies est suivie par la mesure dynamique de la diminution de l'absorbance à 620 nm pendant 4 heures d'incubation avec l'AAPH à 37°C.

La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par HT₅₀ (Half-hemolysis Time), le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes.

2.5.2. Activité de la catalase tissulaire

L'activité enzymatique du catalase (CAT : EC 1.11.1.6) a été déterminée dans l'homogénats de foie, de reins et de cerveau selon la méthode de Ajaghaku *et al.* (2017). Cette méthode est basée sur la diminution de l'absorbance à 240 nm qui est due à la décomposition du H₂O₂ par la catalase. Brièvement, 50 µl de l'homogénat de tissu sont mélangés avec 2.95 ml de tampon phosphate (50 mM; pH=7.4) contient 19 mM de H₂O₂. La réaction est commencée en ajoutant l'homogénat, le changement de l'absorbance est suivi pendant 2 minutes. L'activité de la catalase tissulaire est exprimée en µmole de H₂O₂/mg de protéine. Le coefficient d'extinction de H₂O₂ (43,6 M⁻¹ cm⁻¹) a été utilisé pour déterminer l'activité de catalase.

2.5.3. Dosage de la glutathion tissulaire

L'estimation de la teneur en glutathion réduit (GSH) dans l'homogénat de foie, le rein et de cerveau a été déterminée par la méthode de Marmouzi *et al.* (2017). Le dosage de GSH est basé sur la réaction de DTNB avec les groupements SH qui donne un chromophore de couleur jaune, ce qui permet sa quantification spectrophotométrique à 412. Un volume de 5 ml de tampon phosphate de sodium (0.1 M, pH=8) a été ajoutés à 25 µl de d'homogénat, puis 3 ml de mélange a été ajouté à 20 µl DTNB (0.01 M). L'absorbance est lue à 412 nm après une incubation de 5 min. Les concentrations du glutathion réduit sont exprimées en µmoles de GSH/g de tissu.

2.5.4. Estimation de la peroxydation lipidique

Le procédé de peroxydation des lipides a été déterminée dans l'homogénat de foie, le rein et de cerveau en utilisant d'acide thiobarbiturique (TBA) selon la méthode de Ajaghaku *et al.* (2017). En bref, 125 µl de TCA (20%) et 250 µl de TBA (0,67%) ont été ajoutés à 125 µl d'homogénat tissulaire. Le mélange a été mis à un bain marie à 100 °C pendant 20 min, puis l'échantillon a été refroidi et le complexe MDA-TBA a été extrait avec 1 ml de butanol. La phase organique a été séparée par centrifugation pendant 15 min à 3000 tr/min et mesurée à

530 nm. La concentration en MDA a été calculée par l'absorbance du complexe MDA-TBA ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La peroxydation lipidique a été exprimée en nanomoles MDA/g de tissu.

2.5.5. Le pouvoir réducteur plasmatique

Le pouvoir réducteur plasmatique a été évalué selon la méthode effectuée précédemment *in vitro* (Maazoun *et al.*, 2018). 400 μl de plasma de chaque souris de chaque groupe sont mélangées avec 400 μl de tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6) et 400 μl de ferricyanide de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (1%). Après une incubation à 50°C pendant 20 min et l'ajoute de 400 μl de TCA (10%), le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. Ensuite, 400 μl de surnageant ont ajoutée à 400 μl d'eau distillée et 80 μl de FeCl_3 (0,1%) l'absorbance est lue à 700 nm après une incubation pendant 10 mn.

2.5.6. La capacité antioxydante plasmatique *vis-à-vis* le radical DPPH

La capacité du plasma à piéger le radical DPPH a été évaluée selon la méthode de Moldovan et ses collaborateurs (2017) avec quelques modifications, en se basant sur le même principe que celui du test de DPPH effectuée précédemment *in vitro*. Brièvement, un volume de 50 μL de plasma est additionné à 1250 μl de la solution méthanolique de DPPH (4 mg/100 ml). Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm. Le pouvoir antiradicalaire plasmatique est ensuite calculé selon l'équation ci-dessous :

$$\text{L'activité anti-radicalaire plasmatique (\%)} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Où A_C : absorbance du contrôle (sans extrait)

A_E : absorbance en présence de plasma

2.6. Évaluation de l'activité hépatoprotectrice

L'activité hépatoprotectrice de l'extrait brut contre l'hépatotoxicité expérimentale induite par le tétrachlorure de carbone (CCl_4) a été évaluée selon la méthode de Al-Seeni *et al.* (2016), sur

des souris mâles, *Swiss albinos*, adultes et de poids variant entre 25 et 30 g. Les animaux sont répartis selon l'homogénéité de leurs poids en 6 lots expérimentaux de 8 animaux chacun comme suite :

- **Groupe I:** Groupe témoin normal (contrôle négative) a reçu 0,9% de NaCl seulement pendant 6 jours et une injection intrapéritonéale d'huile d'olive (2 ml/Kg) dans le 5^{ème} jour.
- **Groupe II:** Groupe CCl₄ témoin (contrôle CCl₄ négative) a reçu 0,9% de NaCl seulement pendant 6 jours et une injection intrapéritonéale de CCl₄+huile d'olive (2 ml/Kg) dans le 5^{ème} jour.
- **Groupe III:** Groupe contrôle positive a reçu une dose de 300 mg/kg de vit. C pendant 6 jours et une injection intrapéritonéale de CCl₄+huile d'olive (2 ml/Kg) dans le 5^{ème} jour.
- **Groupe IV, Groupe V et Groupe VI:** Groupes traités par E.Br, ont reçu une dose de 100, 250 et 500 mg/kg d'E.Br respectivement, pendant 6 jours et une injection intrapéritonéale de CCl₄+huile d'olive (2 ml/Kg) dans le 5^{ème} jour.

L'administration de Vit. C et d'extrait est faite par gavage (voie orale) durant la période l'expérience.

2.6.1. Détermination/évaluation des paramètres sérique de l'hépatotoxicité

A la fin de la période du traitement, les animaux sont sacrifiés par décapitation cervicale, après le prélèvement, le sang collecté dans des tubes secs, a été analysé pour différents paramètres biochimiques afin d'évaluer l'hépatotoxicité tels que : L'alanine aminotransférase (ALT), l'aspartateaminotransférase (AST), la phosphatase alcaline (PAL) et bilirubine totale (BT).

2.6.2. Détermination des marqueurs d'hépatotoxicité/stress oxydative

Après la dissection, le foie de chaque souris est rapidement prélevé et bien rincé avec l'eau physiologique froide puis séché sur le papier filtre. Le foie est coupé en petits morceaux, pesé

et enfin homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce dans une solution de KCl (1.15%) à 10% (p/v). L'homogénat obtenu est centrifugé à 4000 tours/min pendant 10 minutes ensuite soumis à l'analyse afin de déterminer les différents marqueurs d'hépatotoxicité/stress oxydative tels que l'activité du CAT tissulaire, le taux de glutathion (GSH) et le taux de la peroxydation lipidique (MDA). L'analyse de ces paramètres a été effectuée selon les protocoles précédents (**Page 51**)

2.7. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne \pm SD et moyenne \pm SEM, respectivement. Les valeurs d'EC₅₀ sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% activité = f (concentration)]. Les sigmoïdes de la cinétique d'hémolyse et la détermination de l'HT₅₀ sont effectués par le logiciel (GraphPadPrism 6). La différence entre le contrôle et les différents tests a été déterminée par le test de *t*-Student pour les comparaisons simples et par ANOVA pour les comparaisons multiples. La détermination des taux de signification a considéré statistiquement dans $p \leq 0.05$.

Résultats

&

Discussion

Résultats et discussion

1. Extraction

Les différents extraits de *T. pallidus* ont été obtenus en suivant la méthode d'extraction des polyphénols décrite par Markham (1982). L'extraction est effectuée en deux grandes étapes, la première est réalisée par le méthanol pour obtenir initialement l'extrait brut, la deuxième étape de fractionnement est réalisée par une série de solvants à polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle) permettant ainsi de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction. L'utilisation de différents solvants, à polarités différentes, a permis de séparer ces composés selon leur degré de solubilité dans le solvant et donc selon leur degré de glycosylation. L'extrait méthanolique (E.Br) contient des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins (Li *et al.*, 2008). L'extrait d'hexane (E.Hx) qui est en générale constitué de lipides et de flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, l'extrait chloroformique (E.Ch) est plus riche en flavonoïdes aglycones, l'extrait d'éthyle acétate (E.EtA) contient les flavonoïdes faiblement glycosylés en particulier mono, di et tri-glycosylés et l'E.Aq peut être constitué des flavonoïdes les plus polaires (hautement glycosylés) (Nakamura *et al.*, 2017). Le rendement de chaque extrait est calculé par rapport de 100 g de la matière sèche de la plante (**Tableau 3**).

La teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits de *T. pallidus* a été déterminée. Les polyphénols sont estimés par la méthode de Folin-Ciocalteu selon Belkhiri *et al.* (2017). Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et phosphomolybdique de réactif de Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleu. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Kupina *et al.*, 2018). Les résultats sont exprimés en µg d'acide gallique équivalent /mg d'extrait. Ils montrent que l'E.EtA a une forte

teneur de polyphénols totaux ($495.12 \pm 1.91 \mu\text{g EAG/mg E}$) par rapport aux autres extrait, suivi par l'E.Br ($285.97 \pm 6.23 \mu\text{g EAG/mg E}$), l'extrait d'hexane présente une faible teneur en polyphénols ($108.17 \pm 5.75 \mu\text{g EAG/mg E}$) (**Tableau 3**).

Tableau 3: Le rendement et la teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits de *T. pallidus*.

Extrait	Rendement %	Polyphénols (mg EAG/g E)	Flavonoïdes (mg EQ/g E)
E.Br	13.04 ± 1.15	285.97 ± 6.23	44.99 ± 2.29
E.Hex	0.51 ± 0.13	108.17 ± 5.75	5.10 ± 0.71
E.Ch	1.65 ± 0.19	167.66 ± 1.90	22.62 ± 1.05
E.EtA	6.89 ± 0.45	495.12 ± 1.92	97.25 ± 2.84
E.Aq	2.51 ± 0.56	233.8 ± 4.23	29.8 ± 0.71

La quantification des flavonoïdes a été effectuée selon Belkhiri *et al.* (2017), basée sur la formation de complexes entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium. Les complexes produits sont de couleur jaune absorbent dans le visible à 430 nm (Lemos *et al.*, 2019). La teneur d'extraits en flavonoïdes a été rapportée en μg quercétine équivalent /mg d'extrait. Les résultats montrent que l'E.EtA est le plus riche en flavonoïdes ($97.25 \pm 2.84 \mu\text{g EQ/mg E}$), suivi par l'E.Br ($44.99 \pm 2.29 \mu\text{g EQ/mg E}$) alors que l'extrait d'hexane présente une faible teneur en flavonoïdes ($5.10 \pm 0.71 \mu\text{g EQ/mg E}$).

L'étude des plantes médicinales commence par les procédures de pré-extraction et d'extraction, ce qui constitue une étape importante dans l'analyse des constituants bioactifs à partir de matières végétales. Il existe plusieurs méthodes d'extraction et l'utilisation de différents solvants pour extraire les composés actifs des plantes (Altemimi *et al.*, 2017). Le rendement d'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, de l'organe utilisé dans l'extraction, des conditions de séchage et de la richesse de chaque espèce avec des métabolites secondaires. La région et la période de récolte sont également des déterminants du rendement (Daoudi *et al.*, 2015; Zhang Q *et al.*, 2018). De plus, la récupération des composés phénoliques dépend

également du type de solvant utilisé, de sa polarité et de la solubilité des composés phénoliques dans les solvants d'extraction (Tanase *et al.*, 2019). Les solvants pourraient affecter significativement les composés phénoliques totaux en raison des différences de polarités des solvants, ce qui pourrait influencer la solubilité des divers constituants présents dans les parties des plantes (Złotek *et al.*, 2016). Les teneurs phénoliques totales dans les extraits de plantes dépendent de la haute solubilité des phénols dans les solvants polaires ce qui fournit une concentration élevée de ces composés dans les extraits obtenus en utilisant ces solvants (Sepahpour *et al.*, 2018).

2. Analyse des extraits par HPLC-DAD-ESI-MS/MS

La chromatographie couplée à la spectrométrie de masse est l'outil analytique le plus utilisé pour la séparation, l'identification et la quantification des composés chimiques dans des mélanges complexes comme des extraits de plante (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2015). Les profils chromatographiques de l'E.Br de *T. pallidus* ainsi que l'E.EtA et l'E.Aq ont été obtenus à 280 nm (**Fig. 15**). Pour la caractérisation des constituants, des analyses HPLC-DAD-ESI-MS/MS ont été effectuées. Les composés présents dans les extraits de *T. pallidus* ont été identifiés en fonction du temps de rétention, des diagrammes de fragmentation, absorbance maximale à UV et de la comparaison avec la littérature et/ou des composés de référence. 49 composés ont été détectés et 48 ont été identifiés, notamment des flavonols, des dihydroflavonols, des monomères d'acides phénoliques et leurs dérivés oligomères. Le temps de rétention, absorbance maximale à UV, la fragmentation de masse et l'identification des constituants sont présentés dans **le tableau 4**.

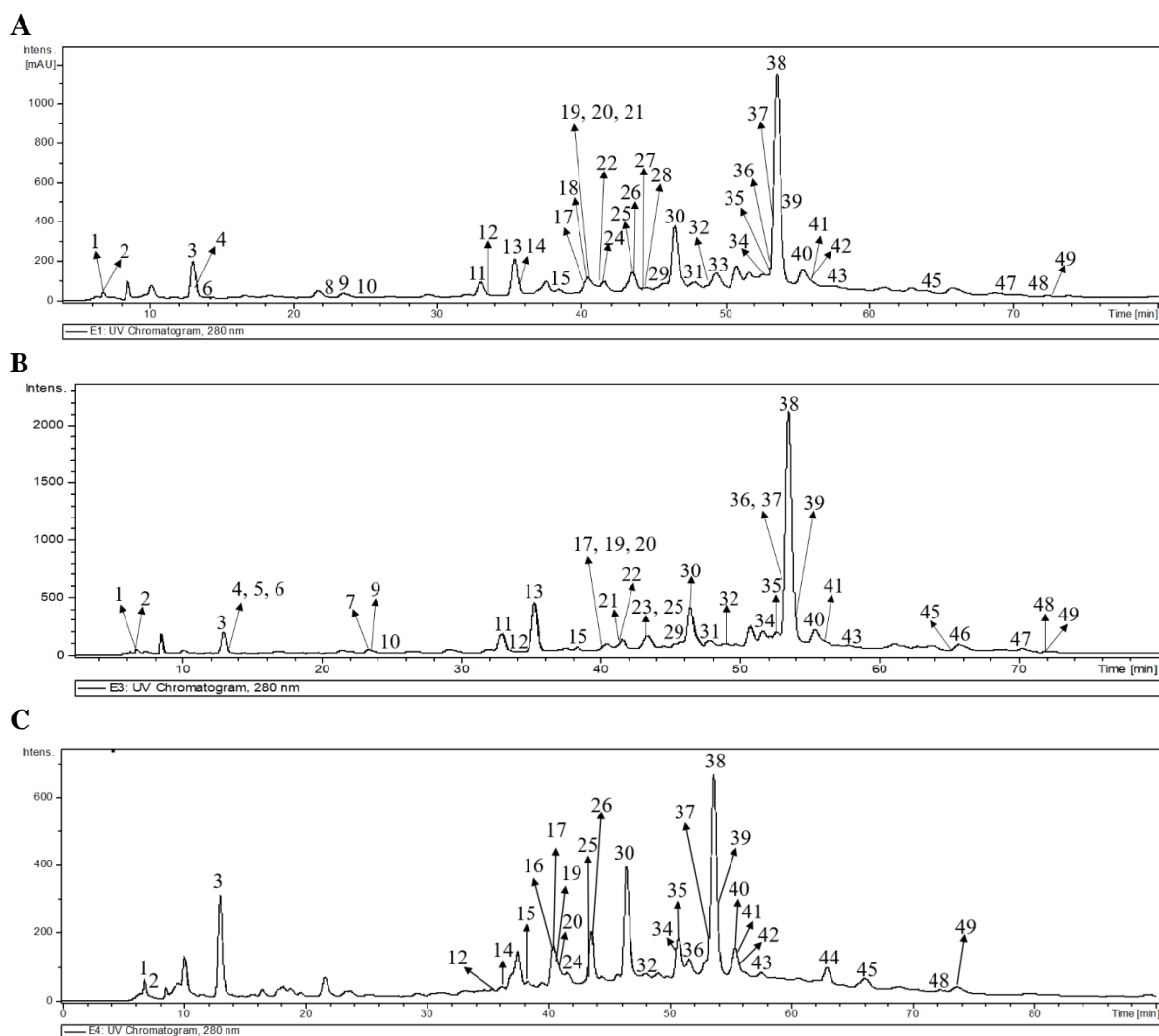


Fig. 15. Les chromatogrammes d'analyse des extraits par HPLC-DAD. A: E.Br; B: E.EtA; C: E.Aq. Les numéros de pics se réfèrent au Tableau 4.

Tableau 4: L'identification des composés des extraits de *T. pallidus* par HPLC-DAD-MS

Pic	Rt (min)	UV (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² et MS ³	Identification
1	5.5		683 [2M-H] ⁻	341, 179, 113	Caffeoyl- <i>O</i> -glucoside
2	5.8		533	190	Acide caffeoquiniquehexoside
3	12.5		197	178 (100), 73 (6)	Acide Syringique
4	12.7		515	353, 191	Acide dicaffeoyl quinique
5	12.9		315	152 (100)	Acide protocatechuiquehexoside
6	13.1	280, 237	763	447.03 (100), 314.90 (61)	Inconnu
7	22.8		466	459, 303	Dihydroquercétinehexoside
8	22.9	323 sh, 285	707	353 (100)	[2M-H] ⁻ Acide caffeoyl quinique dimère
9	23.5		611	449 (100), 287 (6)	Eriodictyol dihexoside
10	25.1		387	369, 207, 163	Acide hydroxy jasmoniqueglucoside
11	32.4	320 sh, 284, 237	449	287	Eriodictyol hexoside1
12	33.0-33.1		659	615 (70), 571 (100), 285 (21)	Dérivé de l'acide yunnaneique
13	34.7	320 sh, 283, 239	449	287, 151	Eriodictyol hexoside2
14	35.3		641	505, 301	Dérivé de quercétineacetyl-hexoside
15	37.7-37.9		571	553 (78), 527 (100), 509 (86), 483 (32), 439 (72), 197 (5)	Acide yunnaneiqueE1
16	39.7		623	461, 285	Luteoline hexoside glucuronoside
17	39.8		623	489 (21), 285 (100)	Dérivé de l'acetyl luteoline hexoside
18	40.0		477	301	Quercétineglucuronide
19	40.1		357	339 (100), 295 (6), 283 (7)	Acide przewalskinique
20	40.2		555	357 (100), 313 (5)	Acide hydroxyl-dihydrolithospermique 1
21	40.6		609	447 (100), 285 (7)	Luteolinedihexoside
22	41.1		571	553 (33), 527 (100), 509 (37), 329 (8), 285 (8)	Acide yunnaneique E 2
23	41.1	346,267	447	285	Luteolinehexoside
24	41.8		735	571 (4), 555 (100), 537 (35), 519 (4)	Acide hydroxyl-dihydro-salvianoliqueB1
25	43.0		597	491 (64), 311 (100), 197 (9)	Dérivé de l'acide salvianolique C
26	43.1		637	461 (100), 285 (1)	Luteoline 7- <i>O</i> -diglucuronoside

27	44.7		735	537, 519, 507, 493	Acide Hydroxyl-dihydro-salvianolique B2
28	45.1		607	269 (100)	Apigenin hexoside glucuronoside
29	45.3		463	301	Quercétine hexoside
30	45.5-45.9	347, 270sh, 255	923 [2M-H] ⁻	461 (100), 285 (100)	[2M-H] ⁻ Luteoline glucuronoside dimère
31	47.4		717	655 (8), 537, 519 (100)	Acide salvianolique E/B 1
32	48.3		719	539 (22), 521 (17), 359 (100)	Acide sargerinique
33	48.8	312, 300sh	515	353 (100), 191 (2)	Acide dicaffeoyl quinique 2
34	51.2		719	555 (100), 539 (7), 519 (25), 475 (8)	Acide dihydrosalvianolique B 1
35	52.1		167	151 (100), 122 (50), 107 (10)	Acide vanillique
36	52.5		805	445 (21), 359 (100)	Acide malonyl dirosmarinique
37	52.5		555	537 (5), 493 (100), 359 (12)	Acide hydroxy-dihydrolithospermique 2
38	52.5-52.7		359	223 (11), 197 (22), 179 (23), 161 (100)	Acide rosmarinique
39	53.0		493	359 (100), 295 (66)	Acide salvianolique A1
40	54.6		717	555 (12), 519 (100), 357 (1)	Acide salvianolique E/B2
41	54.9	330, 290sh	495	359 (100), 161 (5)	Dérivé de l'acide rosmarinique
42	55.1		519	357 (100), 340 (8)	Acide Przewalskinique hexoside
43	56.8		657	521 (100), 493 (57), 359 (85)	Dérivé de l'acide rosmarinique hexoside
44	62.3		493	383 (9), 359 (15), 313 (8), 295 (100)	Acide salvianolique A2
45	64.4		719	555 (8), 519 (100), 359 (6)	Acide dihydrosalvianolique B2
46	64.8		521	359 (100)	Acide rosmarinique hexoside
47	69.5		375	179, 178 (100), 135 (7)	Acide hydroxyrosmarinique
48	72.1		553	519 (100), 353 (17)	Dihydro-méthyl salvianolate H/I
49	73.0		493	449, 313, 295	Acide salvianolique A3

2.1. Les acides hydroxybenzoïques

Trois dérivés de l'acide hydroxybenzoïque ont été détectés, y compris les composés **3**, **5** et **35**. Ainsi, les composés ont été identifiés comme l'acide syringique, Acide protocatechuique-hexoside et l'acide vanillique, respectivement.

2.2. Les acides hydroxycinnamiques

Le composé **1** a été identifié comme caffeoyl-*O*-glucoside, basé sur MS. Les composés **2**, **4** et **33** ont montré des ions moléculaires de 533, 515 et 515 amu, respectivement. Le composé **2** été attribué à l'acide caffeoquinique hexoside. Les composés **4** et **33** ont présenté deux pertes neutres successives de fractions de caféine (162 amu), ont été identifiés comme des acides dicaffeoyl-quiniques (Clifford *et al.*, 2003). Le composé **8** a montré deux d'absorption UV à 323 et 285 nm, confirmant l'identité du composé comme un acide caffeoyl-quinique.

Les composés **15** et **22** ont présenté des ions [MH] à m/z 571. La fragmentation MS/MS de 15 a donné des ions à m/z 527, 483, 439 et 197, en accord avec l'acide yunnaneique E (Liu *et al.*, 2007). Le composé **22** a montré des ions MS/MS à m/z 527, 329 et 285, caractéristique d'un isomère E de l'acide yunnaneique. Les composés **15** et **22** ont été attribués comme l'acide yunnaneique E et l'acide yunnaneique E2, respectivement (Liu *et al.*, 2007). Le composé **12** ([M-H]⁻ ion à m/z 659) perde deux unités de CO₂ conduisant au motif de fragmentation caractéristique de l'acide yunnaneique E avec des ions MS/MS à m/z 571 et 285 (Liu *et al.*, 2007). Le composé **12** a été provisoirement assigné comme un dérivé de l'acide yunnaneique. Les composés **19** et **42** présentaient des ions moléculaires à m/z 357 et 519, respectivement, ont été assignés comme un acide przewalskinique et son hexoside, respectivement identifiées (Chen *et al.*, 2011). Les composés **20** et **37** ont présenté un ion pseudomoléculaire à m/z 555. Le composé **20** a conformémt à l'acide lithospermique (Chen *et al.*, 2011). De même, le composé **37** a montré des fragments MS/MS à m/z 537, 493 et 359, caractéristique de l'acide lithospermique A (Barros *et al.*, 2013). Comme les ions moléculaires des deux constituants

étaient 18 amu supérieurs à ceux de l'acide lithospermique, les composés **20** et **37** étaient temporairement affectés comme l'acide hydroxyl-dihydrolithospermique 1 et 2, respectivement.

Les composés **24** et **27** avec un ion moléculaire à m/z 735 ont montré des pertes neutres d'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)-lactique, d'eau et de dioxyde de carbone, conduisant à les ions MS/MS à m/z 537,519 et 493, ils ont été désignés provisoirement comme l'acide hydroxy-dihydro-salvianolique B 1 et 2, respectivement. Le composé **25** a présenté un ion moléculaire de 597 amu, et a été provisoirement assigné comme un dérivé de l'acide salvianolique C (Liu *et al.*, 2007).

Les composés **31** et **40** ont montré un ion moléculaire de 717 amu, conduisant à une base de pic à m/z 519, Les composés ont été provisoirement assignés comme un acide salvianolique E/B1, respectivement (Liu *et al.*, 2007). De plus, trois composés sont détectés **32**, **34** et **45** avec un ion moléculaire à m/z 719, qui ils ont été identifiés comme un acide sargerinique, l'acide dihydrosalvianolique B1 et 2, respectivement (Tang *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2013). Le composé **48**, avec $[M-H]^-$ ion à m/z 553, a été identifié de manière provisoire comme un dihydro-méthyl-salvianolate H/I (Liu *et al.*, 2007).

Les composés **39**, **44** et **49** ont montré un ion moléculaire à m/z 493 et une perte neutre de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)-lactique (198 amu), conduisant à un ion fragment intense à m/z 295, en accord avec les isomères d'acide salvianolique A (Barros *et al.*, 2013).

Les composés structurellement apparentés **36**, **38**, **43**, **46** et **47** ont présenté des ions moléculaires à m/z 805, 359, 657, 521 et 375, respectivement. Les composés **36** et **38** ont été identifiés comme l'acide malonyl dirosmarinique et l'acide rosmarinique, respectivement (Barros *et al.*, 2013).

De même, les composés **43** et **46** ont montré un ion fragment à m/z 359, après une perte neutre d'hexose (162 amu), les composés **43** et **46** ont été identifiés provisoirement comme un dérivé d'acide rosmarinique-hexoside et un acide rosmarinique-hexoside, respectivement. Le composé **47** a présenté un ion moléculaire 16 amu supérieur à l'acide rosmarinique, suggérant un atome d'oxygène supplémentaire dans la molécule et a montré une perte neutre de 196 amu. Le composé **47** a été provisoirement identifié comme un acide hydroxyrosmarinique. Le composé **41** apparenté ($[M-H]^-$ de 495 amu) a montré une perte neutre de 136 amu, Le composé **41** a été provisoirement identifié comme un dérivé de l'acide rosmarinique (Liu *et al.*, 2007).

2.3. Les flavonoïdes

Quatorze flavonoïdes ont été identifiés dans les extraits de *T. pallidus*, y compris un dihydroflavonol (composé **7**), trois flavanones (composés **9**, **11** et **13**), trois flavonols (composés **14**, **18** et **29**) et sept flavones (composés **16**, **17**, **21**, **23**, **26**, **28** et **30**). Le composé **7** a montré une perte neutre d'un hexose (162 amu) à partir du $[M-H]$ -ion à m/z 465, conduisant à un pic intense à m/z 303, en accord avec un noyau de dihydroquercétine/taxifoline. Ainsi, il a été provisoirement identifié comme un dihydroquercétine-hexoside. Les spectres de masse des composés **11** et **13** ont montré le même $[MH]$ -ion à m/z 449 et une perte neutre d'un hexose (162 amu), tandis que le composé **9** avec un $[MH]$ -ion à m/z 611 a présenté la perte de deux unités d'hexose, conduisant à un ion MS/MS à m/z 287 compatible avec un noyau de eriodictyol. Les composés **9**, **11** et **13** ont été désignés provisoirement comme un erydiodicol dihexoside et un eriodictyol-hexoside 1 et 2, respectivement. Trois dérivés de la quercétine ont été détectés (composés **14**, **18** et **29**) avec des ions moléculaires à m/z 641, 477 et 463 amu, respectivement, conduisant au fragment MS/MS à m/z 301, caractéristique de la quercétine. Le composé **14** perd un fragment de 136 amu et d'acétyle hexose (204 amu), tandis que le composé **18** perd un glucuronyl (176 amu)

et le composé **29** un hexose (162 amu), étant provisoirement identifié comme le dérivé de quercétine acétyl-hexoside, la quercétine glucuronide et quercétine-hexoside, respectivement.

Les flavones ont également été identifiés provisoirement dans l'échantillon, y compris six luteolines et un dérivé de l'apigénine. Les composés **16** et **17** présentaient le même ion moléculaire à m/z 623. Dans les deux composés, l'ion MS^2 à m/z 285 a été détecté, en accord avec les dérivés de luteoline. Le composé **16** a montré des pertes neutres d'un hexose (162 amu) et du glucuronyl (176 amu), tandis que des pertes neutres d'un fragment non identifié (134 amu) et d'un acétylhexoside (204 amu) ont été détectées dans **17**. Par conséquent, ces composés ont été identifiés provisoirement en tant que de lutéole-hexoside glucuronide et dérivé de luteoline acétyl hexoside, respectivement. Les composés **21**, **23**, **26** et **30** ont montré $[M-H]^-$ ions à m/z 609, 447, 637 et 923 amu, respectivement, conduisant à l'ion MS/MS à m/z 285, en accord avec les dérivés de luteoline. Les composés **21** et **23** ont montré la perte neutre de deux hexoses et un hexose, respectivement, en accord avec le luteolinedihexoside et luteoline, respectivement. Le composé **26** qui a montré les pertes neutres de deux unités de glucuronyl est compatible avec le luteoline 7-*O*-diglucuronoside. Le composé **30** a été désigné par un dimère de $[2M-H]^-$ et identifié comme un luteoline glucuronoside, basé sur les fragments MS/MS à m/z 461 et 285. Le composé **28** a été identifié comme étant un glucuronide d'apigénine-hexoside, sur la base de la perte neutre de glucuronyl hexose (338 amu) conduisant à la base de crête MS/MS à m/z 269.

2.4. Les composés Non-phénoliques

Un dérivé d'acide jasmonique (composé **10**) a été identifié provisoirement dans l'extrait de *T. pallidus*. Le composé a montré un $[M-H]^-$ ion à m/z 387, conduisant aux ions MS/MS à m/z 369, 207 et 163, en accord avec l'acide hydroxy-jasmonique glucoside (Pereira *et al.*, 2013).

3. Etude de l'activité antioxydante *in vitro*

3.1. Inhibition de la xanthine oxydase

L'effet inhibiteur des extraits de *T. pallidus* sur l'activité XO a été déterminé spectrophotométriquement en suivant la production de l'acide urique à 295 nm (Belkhiri *et al.*, 2017). Les résultats obtenus montrent que tous les extraits inhibent d'une manière dose-dépendante l'activité de l'enzyme XO (**Fig. 16**).

Les valeurs des IC_{50} des différents extraits démontrent que le pouvoir inhibiteur de l'E.EtA est plus importants ($IC_{50}=51.6\pm 2 \mu\text{g/ml}$) et le plus proche de celui de l'allopurinol, l'inhibiteur spécifique de la XO ($IC_{50}=12.4\pm 0.5 \mu\text{g/ml}$). Les trois autres extraits présentent une activité inhibitrice modéré avec des $IC_{50}= 295.7, 355.87$ et $313.29 \mu\text{g/ml}$, pour E.Br, E.Ch et E.Aq respectivement pour (**Fig. 17**).

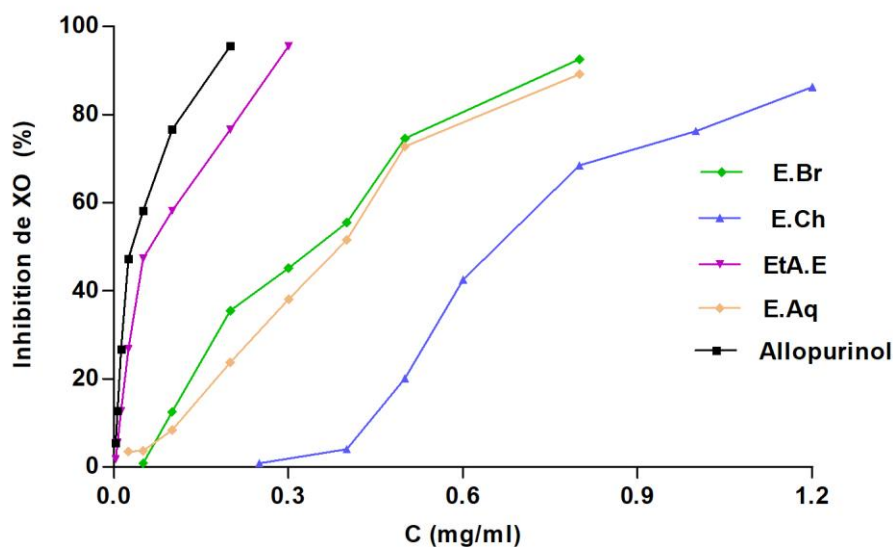


Fig. 16: Cinétique de l'inhibition de la XO par les extraits de *T. pallidus*.

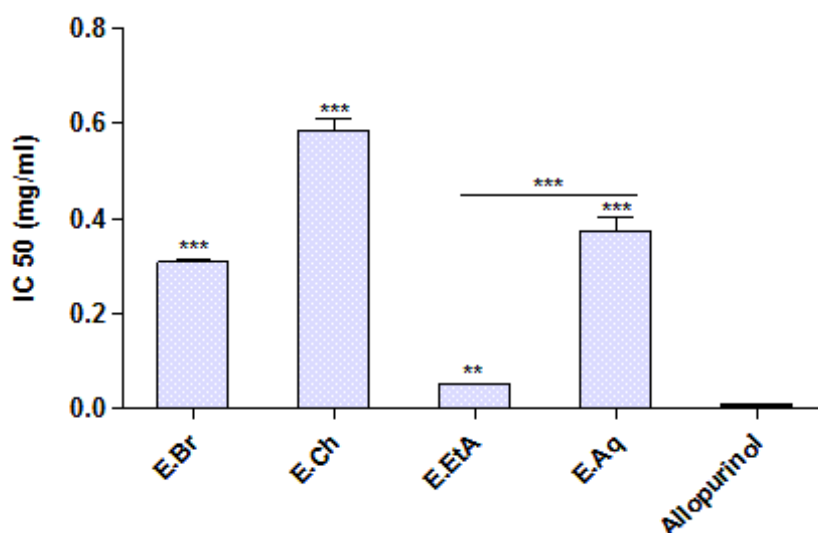


Fig. 17: Effet inhibiteur de différents extraits de *T. pallidus* sur l'activité XO. (Les valeurs sont exprimées en moyennes±SD, n=3. Les comparaisons sont faites par rapport Allopurinol; ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits des plantes sur l'activité de XO. Cet effet est attribuée à différents composés tels que les polyphénols et les flavonoïdes (Baghiani *et al.*, 2010; Irondi *et al.*, 2019). Les résultats obtenus montrent une forte corrélation entre la teneur en polyphénols des extraits et l'effet inhibiteur sur la XO ($R^2=0.9266$), dont l'E.EtA le plus riche en polyphénols et flavonoïde est le meilleur inhibiteur de la XO. En se basant sur la corrélation entre la concentration en polyphénols et flavonoïdes et l'inhibition de la XO par ces extraits, des résultats similaires sont observés par plusieurs études. Ils ont constaté que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les plus actifs sur la XO (Fu *et al.*, 2018; Quy et Xuan, 2019). L'inhibition de la XO par les flavonoïdes pourrait être liée non seulement à la concentration en polyphénols et flavonoïdes, mais aussi à la nature (structure) de ces composés. Plusieurs chercheurs ont déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice de la XO. La présence de la double liaison entre les carbones C2 et C3 du cycle A des flavonoïdes est très importante pour l'inhibition. Cette double liaison et la conjugaison qu'elle induit, entraîne la coplanarité du cycle B avec les cycles A et C. Une structure plane est en effet nécessaire pour

une haute activité inhibitrice vis-à-vis de la XO (Lin *et al.*, 2015; Santi *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2019). La structure catéchol, le nombre et la position des fonctions alcooliques ainsi que la présence de la fonction 4-oxo sur la structure pyranique permettent l'augmentation de l'effet inhibiteur des flavonoïdes sur l'activité XO (Dong *et al.*, 2016 ; Zhang C *et al.*, 2018).

L'inhibition de l'activité XO a été attribuée à différents composés tels que les polyphénols comme les flavonoïdes et les anthocyanosides. Les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la XO et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations de l'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains (Ojha *et al.*, 2017; Abu-Gharbieh *et al.*, 2018). Les inhibiteurs de la XO et en particulier les flavonoïdes présentent un type d'inhibition compétitif où ils agissent sur le site actif molybdène (Mo) de l'enzyme (Mathew B *et al.*, 2015; Zhang C *et al.*, 2018). La différence d'effet inhibiteur des extraits de *T. pallidus* peut être due aux différences de type et de quantité des différents composés présents dans les extraits.

3.2. Test d'ABTS

Diverses méthodes sont utilisées pour évaluer la capacité antiradicalaire/antioxydante de produits naturels à partir de plantes. Ces méthodes chimiques sont basées sur la capacité des composés à éliminer les radicaux libres synthétiques. Le DPPH et ABTS sont des radicaux libres largement utilisés comme modèle pour estimer la capacité antioxydante de plusieurs extraits de plantes (Olszowy et Dawidowicz, 2018; Kasote *et al.*, 2019). L'activité antiradicalaire *in vitro* des extraits de *T. pallidus* vis-à-vis les radicaux libres est déterminé par le test d'ABTS. C'est un procédé pour le criblage d'activité antioxydante, il est signalé comme un essai de décoloration du cation radicalaire ABTS⁺ qui est généré par l'oxydation de l'ABTS avec le persulfate de potassium et réduit en présence de tels antioxydants. L'activité antiradicalaire est estimée par la valeur EC₅₀ qui se lie à la capacité antioxydante, elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire la concentration en DPPH de 50%, plus la

valeur EC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Oliveira *et al.*, 2016). L'E.EtA, l'E.Aq et l'E.Br ont montré une bonne activité anti-radicalaire ($EC_{50}=3.21\pm 0.003$, 4.12 ± 0.004 et 6.23 ± 0.006 $\mu\text{g/ml}$, respectivement), par contre L'E.Ch et BHT ont présenté une faible activité ($EC_{50}=24.00\pm 0.025$ et $EC_{50}=33.9\pm 0.5$ $\mu\text{g/ml}$, respectivement) (Fig. 18).

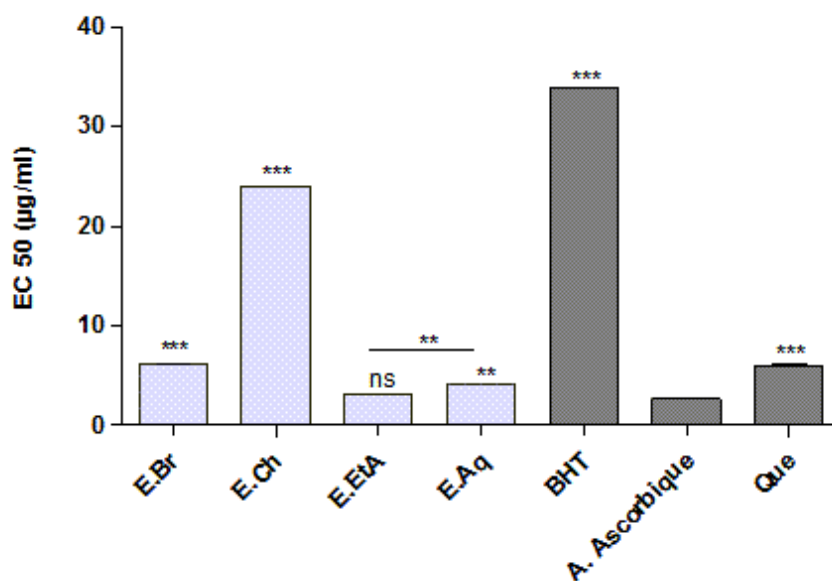


Fig. 18: L'activité antiradicalaire des extraits et des standards par le test d'ABTS exprimé en valeurs EC_{50} . (Les valeurs sont des moyennes \pm SD, $n=3$. ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

Les résultats montrent qu'il y a une corrélation modérée entre l'activité antiradicalaire vis-à-vis des radicaux d'ABTS et la teneur des extraits en polyphénols et en flavonoïdes ($R^2 = 0.47$ et 0.77 , respectivement). De tels résultats suggèrent que l'activité antiradicalaire pourrait être liée non seulement aux teneurs en polyphénols d'extraits mais à la nature (structure) de composés trouvés dans ces extraits. Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le radical ABTS dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (Li *et al.*, 2018). L'activité antiradicalaire d'antioxydants naturels tels que l'acide phénolique et les flavonoïdes pourrait être due à leur richesse en groupement d'hydroxyles. La configuration spatiale et le nombre de groupes OH de structures flavonoïdes peuvent influencer différents mécanismes antioxydants (Huyut *et al.*, 2017). Les résultats montrent une différence dans l'ordre d'activité

anti-radicalaire (d'efficacité) des extraits (E.Br, E.Ch et E.Aq) et confirment l'efficacité d'E.EtA. Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux mécanismes : 1) La libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycolyses et des anthocyanes). 2) Dans le cas des composés phénoliques, le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le radical alors il se transforme en une molécule stable (Mathew, S *et al.*, 2015; González *et al.*, 2018).

3.3. Test d'hémolyse

L'oxydation des érythrocytes sert de bon modèle pour les dommages oxydatifs des membranes biologiques, leur facilité d'isolement, leur simplicité, la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration élevée d'oxygène et d'hémoglobine (Hammoudi *et al.*, 2017). L'activité anti-hémolytique des extraits a été évaluée selon le protocole décrit par Bonamigo *et al.* (2017), et mesurée comme la capacité des globules rouges (hématies) pour résister à l'hémolyse ou la lyse induite par les radicaux libres. Ce test permet le suivi du pouvoir anti-radicalaire de molécules naturelles à usage pharmaceutique *in vitro* et *in vivo* (Lins *et al.*, 2018). L'efficacité des extraits pour renforcer le système anti-radicalaire des érythrocytes est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (HT₅₀).

Les résultats de l'activité anti-hémolytique des extraits de *T. pallidus* présentée dans la **Fig. 19** ont montré que les extraits peuvent protéger efficacement les érythrocytes contre les lyses hémolytiques induites par AAPH. L'E.EtA, l'E.Ch et l'E.Br présentaient une activité anti-hémolytique puissante, cette activité est manifeste par l'augmentation des valeurs de HT₅₀ (HT₅₀ = 109.44±2.99, 94.26±4.19 et 83.45±4.71 min, respectivement) par rapport au témoin (HT₅₀ = 60.67±3.64 min). Cependant, le traitement des érythrocytes avec l'E.Aq ne présente aucun effet sur HT₅₀. Les résultats indiquent que le traitement des globules rouges par la quercétine (HT₅₀ = 243.73±6.12 min) augmente les valeurs de HT₅₀ 4 fois par rapport au

témoin. D'autre parts, les résultats reflèteNT une faible corrélation entre la teneur d'extraits en polyphénols et leur activité anti-hémolytique ($R^2= 0.4693$).

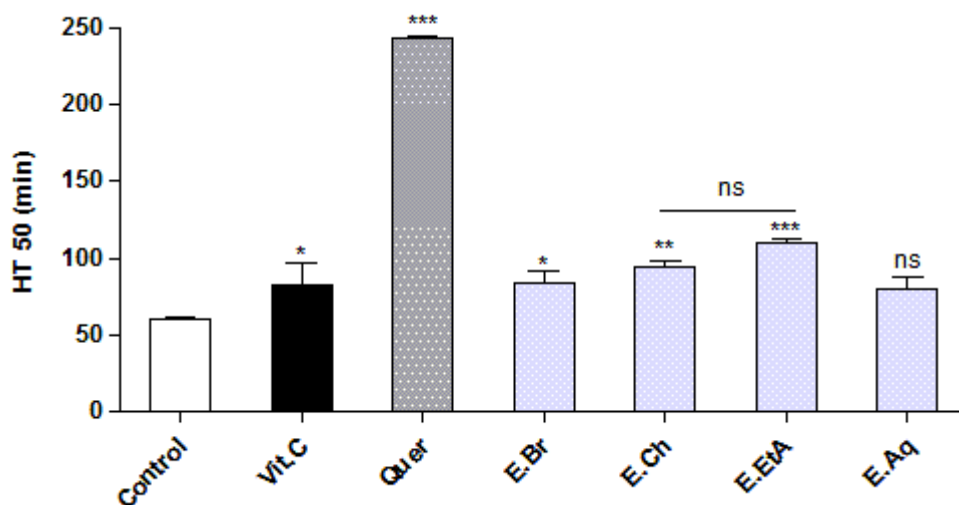


Fig. 19: Activité anti hémolytique *in vitro* de vit. C et des extraits de *T. pallidus* (Les valeurs sont des moyennes \pm SD, n=3. ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

Le test de l'inhibition de l'hémolyse, provoquée par un oxydant, est considéré comme un bon test pour estimer l'activité antioxydante des systèmes biologiques. Le dichlorhydrate de 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH) est un composé chimique utilisé pour étudier la chimie de l'oxydation générant des radicaux libres, principalement les radicaux peroxydes. Les membranes biologiques peuvent être affectées par de nombreux produits naturels présents dans les plantes médicinales. Plusieurs auteurs ont mentionné que les composés phénoliques et les flavonoïdes ont un effet bénéfique sur la stabilité de la membrane des érythrocytes (Suwalsky *et al.*, 2015; Anosike *et al.*, 2018). Étant donné que les composés phénoliques semblent fonctionner comme de bons donneurs d'électrons et d'atomes d'hydrogène, ils peuvent donc mettre fin à la réaction radicalaire en chaîne en convertissant les radicaux libres et les ROS en produits plus stables (Castro *et al.*, 2018; Huang, 2018). De ce fait, si les antioxydants, tels que la vitamine E, la vitamine C et les flavonoïdes, sont ajoutées à une suspension érythrocytaire, ils réagissent avec les lipides membranaires pour mettre fin à la

peroxydation, par conséquent l'inhibition de l'hémolyse (Anosike *et al.*, 2018). En outre, Afsar et ses collaborateurs (2016) ont comparé les résultats d'hémolyse avec les résultats de l'inhibition de peroxydation lipidique. Ils ont montré que les antioxydants qui ne scavengent pas rapidement le radical DPPH ou ABTS^{•+}, ne sont pas toujours de faibles antiradicalaires érythrocytaires. Ces résultats sont en accord avec les résultats que nous avons obtenus.

3.4. Chélation du fer ferreux

La capacité de chélation des métaux est importante car elle réduit le métal de transition jouant le rôle de catalyseur pour générer les premiers radicaux et initier les réactions en chaîne oxydatives induites par les radicaux dans les systèmes biologiques ou alimentaires (Capanoglu *et al.*, 2018). Les agents chélateurs d'ions peuvent également inhiber la réaction de Fenton et la peroxydation des lipides. Ainsi, la capacité d'un antioxydant à chélater les métaux est une propriété antioxydante importante à mesurer. Les ions ferreux sont généralement présents dans les systèmes alimentaires et sont considérés comme des pro-oxydants efficaces (Adjimani et Asare, 2015). La capacité chélatrice est très importante du fait qu'elle réduit la concentration de métaux de transitions catalyseurs de la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxy et alcoxy qui peuvent à leur tour entretenir la réaction en chaîne (Zielinski et Pratt, 2017).

La capacité chélatrice des extraits a été estimée selon la méthode d'Ademiluyi *et al.* (2018), dont laquelle, la ferrozine peut former un complexe coloré (couleur violette) avec le fer (Fe^{+2}); chromophore rouge ayant un maximum d'absorption à 562 nm. En présence d'agents chélateurs, le complexe des ions ferrozine- Fe^{+2} est perturbé, ce qui entraîne une diminution de la couleur du complexe. La mesure de la réduction de la couleur a permis d'estimer l'activité de chélation des métaux pour le chélateur coexistant (Santos *et al.*, 2017).

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits de *T. pallidus* ainsi que les standards interfèrent d'une manière dose dépendante avec l'inhibition de formation du complexe (Fe^{+2} -ferrozine), suggérant qu'ils possèdent une activité chélatrice tout en capturant l'ion ferreux avant qu'il soit complexé avec la ferrozine. Pour mieux caractériser l'efficacité des extraits, leur activité chélatrice est exprimée en termes de μg EDTA équivalent/ mg d'extrait. A partir des résultats obtenus, l'E.EtA et E.Br semblent avoir l'activité chélatrice la plus importante (53.38 ± 1.03 et 32.64 ± 0.48 μg EDTA/mg E, respectivement) (**Fig. 20**). Cette activité était encore beaucoup mieux que l'activité de la quercétine ($19,32$ μg EDTA/mg d'extrait). La capacité chélatrice de l'E.Ch et l'E.Aq reste faible par rapport d l'E.EtA ($15,58 \pm 0,60$ et $11,90 \pm 0,34$ μg EDTA/mg d'extrait, respectivement).

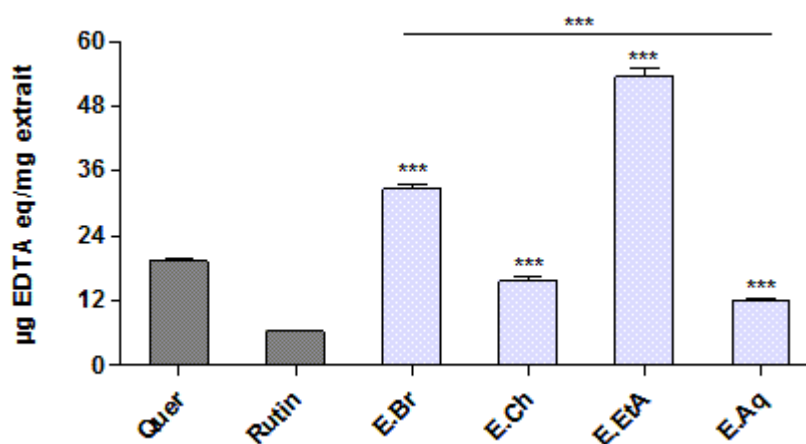


Fig. 20: Activité chélatrice des extraits de *T. pallidus* et de la quercétine. (Les valeurs sont des moyennes \pm SD, n=3. ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

De nombreuses études ont évalué l'effet chélateur des ions ferreux par les extraits de diverses plantes. Selon la littérature, les composés phénoliques s'avèrent comme des excellents agents chélateurs des ions métalliques (Sales *et al.*, 2019). Cependant, les résultats montrent une forte corrélation entre l'activité chélatrice des extraits et la teneur en polyphénols ($R^2 = 0.8922$). Ces constatations pourraient indiquer que les composés phénoliques sont les principaux chélateurs présents dans les extraits. De plus, la capacité chélatrice d'un composé phénolique dépend de la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels

convenablement orientés (Della et Compagnone, 2018). Nos résultats conviennent avec ceux découverts par Raudone et ses collaborateurs (2019), qu'ils ont indiqué qu'il'y a une corrélation entre la teneur en composés phénoliques des extraits de *Vaccinium vitis-idaea* et leur activité chélatrice. Plusieurs études montrent que seuls les composés phénoliques ayant une structure et des groupes fonctionnels déterminés peuvent agir en tant que chélateurs des métaux de transition et présenter une activité chélatrice (Papucet *al.*, 2017; Jucá *et al.*, 2018).

3.5. Pouvoir réducteur

L'activité antioxydante d'un produit est généralement liée à sa capacité réductrice d'où l'utilisation du pouvoir réducteur comme une technique fiable pour évaluer l'activité antioxydante de divers composés et d'extraits de plantes. Le pouvoir réducteur est souvent utilisé pour évaluer la capacité de l'antioxydant à donner des électrons (Haida et Hakiman, 2019). Les polyphénols peuvent rompre la chaîne des radicaux libres en donnant des électrons et, pour cette raison; le pouvoir de réduction des métaux de transition des polyphénols est corrélé à leur activité antioxydante (Papuc *et al.*, 2017). La technique permet de mesurer la réduction du Fe^{+3} (sous forme potassium ferricyanide) en Fe^{+2} (sou forme potassium ferrocyanide) qui réagit avec chlorure de fer pour former un complexe avec une absorbance maximale a 720 nm en présence d'antioxydants (Apak *et al.*, 2016). Pour mieux caractériser le pouvoir réducteur des extrait, les résultats sont exprimés en termes de μg équivalent d'acide ascorbique/mg d'extrait (**Fig. 21**). Les résultats montrent que le pouvoir réducteur de l'extrait E.EtA est le plus puissant parmi les extraits testés ($927.73 \pm 5.11 \mu g$ acide ascorbique equ / mg E), suivi par l'E.Br ($312.36 \pm 5.15 \mu g$ equ acide ascorbique/mg E). L'E.Ch et l'E.Aq présentent un pouvoir réducteur similaire (136.10 ± 4.84 et $131.72 \pm 9.25 \mu g$ acide ascorbique équ/mg d'extrait respectivement). Cependant, le pouvoir réducteur de la quercétine est relativement plus prononcée que celle de tous les extraits ($2.109 \pm 8.12 \mu g$ ascorbique équivalents/mg d'extrait).

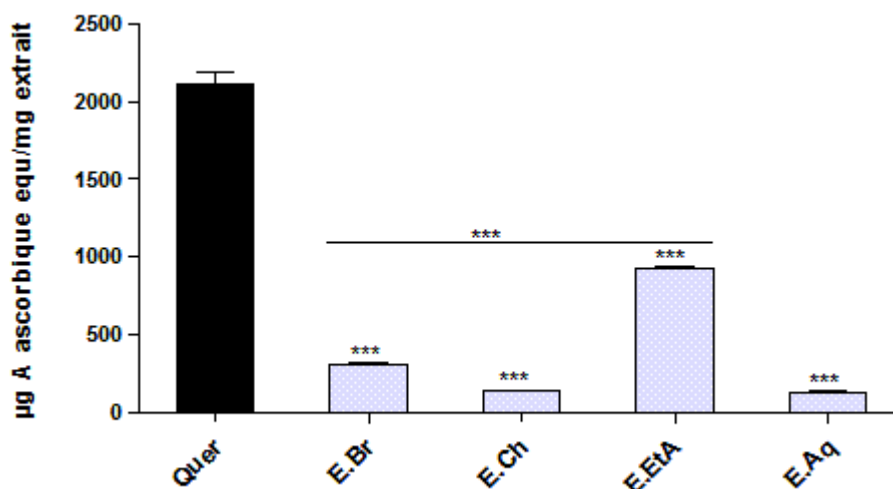


Fig. 21 : Pouvoir réducteur de la quercétine et des extraits de *T. pallidus*. (Les valeurs sont des moyennes \pm SD, n=3. ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

Différentes méthodes ont été développées pour mesurer le pouvoir réducteur d'un antioxydant, ces techniques diffèrent essentiellement par les types de réactions mises en jeu. Les méthodes utilisées pour évaluer la capacité antioxydante donne des résultats qui peuvent varier significativement. Ces différences sont principalement dues aux réactivités différentes des antioxydants avec les différents indicateurs utilisés (Amorati et Valgimigli, 2018).

D'après les résultats, le pouvoir réducteur/antioxydant de différents extraits de *T. pallidus* semble avoir une forte corrélation positive entre la capacité réductrice des extraits et leur contenu à la fois des polyphénols ($R^2 = 0,9573$). Ces résultats sont comparables avec ceux trouvés par Li et ses collaborateurs, (2008) où ils ont étudié l'activité antioxydante de 45 plantes par la technique FRAP et ils ont montrés l'implication des polyphénols dans l'activité antioxydante de ces plantes où il existe une corrélation linéaire entre la teneur de ces plantes en polyphénols et leur activité antioxydante.

Les composés phénoliques et les flavonoïdes en particulier sont connus pour leurs propriété réducteur/antioxydante (Weidner *et al.*, 2018). La configuration spatiale et le nombre de groupement OH des flavonoïdes peuvent avoir une influence sur les différents mécanismes

antioxydants (Tzima *et al.*, 2018). Trois critères principales peuvent conférer aux flavonoïdes un grand effet antioxydant: la structure 3'-4'-catechol du cycle B (structure ortho-diphénolique), la présence du groupement 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 adjacente à la fonction 4-oxo et la présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo (carbonyle). Ces trois critères sont présents dans la quercétine lui permet d'être un puissant réducteur (Sarian *et al.*, 2017).

3.6. Piégeage du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène peut être formé *in vivo* par diverses enzymes oxydantes telles que la superoxyde dismutase. Il peut passer à travers les membranes biologiques lentement. Le peroxyde d'hydrogène est utilisé dans la flambée oxydative des phagocytes activés (Warris et Ballou, 2018). Bien que le H₂O₂ lui-même ne soit pas très réactif, il peut parfois être toxique pour les cellules, en raison de sa capacité à traverser les membranes biologiques et il peut parfois être très toxique pour les cellules en présence de métaux tels que Fe⁺² ou Cu⁺². Il peut générer le radical hydroxyle, hautement réactive, par l'intermédiaire de la réaction de Fenton car il peut donner lieu à un radical •OH dans les cellules qui peut initier la peroxydation des lipides et endommager l'ADN (Sumathi et Anuradha, 2016). Par conséquent, l'élimination de H₂O₂ est très importante pour la défense anti-oxydante dans le système cellulaire.

La capacité des extraits à piéger le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été réalisée selon Perera *et al.* (2016). Les résultats sont présentés en tant que moyenne de trois répétitions et la concentration requise pour obtenir un effet de balayage de 50% (CE₅₀) de peroxyde d'hydrogène de balayage a été déterminée graphiquement. Tous les extraits ont présenté une activité de piégeage efficace contre les radicaux de peroxyde d'hydrogène (**Fig. 22**). Les résultats ont montré que, l'E.EtA a une forte activité (EC₅₀=12.12±0.05 µg/ml) par rapport les autres extraits qui présentent une faible activité (EC₅₀=101.83±4.04, 162.40±2.72 et 109.29±5.60 µg/ml, pour l'E.Br, l'E.Ch et l'E.Aq respectivement).

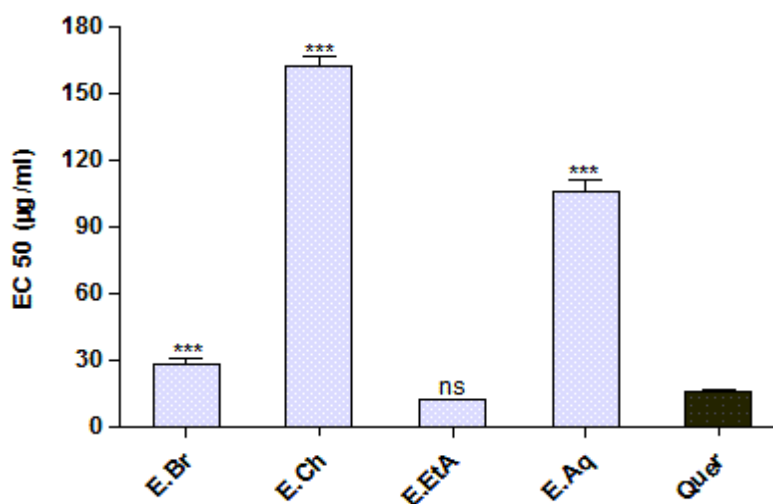


Fig. 22: Piégeage du peroxyde d'hydrogène par les extraits de *T. pallidus* exprimé en valeurs EC₅₀. (Les valeurs sont des moyennes \pm SD, n=3. ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

Selon des rapports récents, une relation hautement positive entre les phénols totaux et l'activité de piégeage H₂O₂ semble être la tendance observée chez de nombreuses espèces de plantes (Ruskin *et al.*, 2017), ce qui suggère que les composés phénoliques pourraient être responsables de cette activité antioxydante. Toutefois, dans notre étude, l'analyse de corrélation a révélé une forte corrélation entre la teneur en polyphénols des extraits et l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène ($R^2 = 0.904$). Nos résultats concordent avec ceux découverts par Sharifi-Rad et ses collaborateurs (2018) qui ont indiqué qu'il 'y a une corrélation entre le contenu en composés phénoliques des extraits et leur activité de piégeage de H₂O₂

3.7. Test de β -carotène/ l'acide linoléique

La méthode de blanchissement β -carotène est largement utilisée pour mesurer l'inhibition de la peroxydation lipidique et l'activité antioxydante des extraits de plantes. Le mécanisme de la β -carotène est un phénomène à médiation par les radicaux libres résultant de l'oxydation de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophoto-

métriquement à 490 nm (Aminjafari *et al.*, 2018). Le radical formé attaque alors les molécules β -carotène hautement insaturés. La présence d'un antioxydant dans les différents extraits peut protéger l'étendue et peut empêcher l'attaque et de conserver la couleur jaune-orange du β -carotène (inhibe le blanchissement) par neutralisant le radical libre linoléate et d'autres radicaux libres formés dans le système (Edge et Truscott, 2018). Dans ce test, la capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de la β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Delfanian et ses collaborateurs (2018). D'après les résultats, il est évident que tous les extraits testés et les standards inhibent d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β carotène. La cinétique de blanchissement du β -carotène en présence des extraits de *T. pallidus* et des standards est représentée sous forme d'activité antioxydante relative (AAR%) (Fig. 23). Les valeurs de pourcentage de l'effet antioxydant à 24 h montrent que l'E.Ch et l'E.Aq ont la plus grande activité antioxydante ($81.81 \pm 1.60\%$ et $80.86 \pm 1.81\%$ respectivement). Cette activité est inférieure à celle du BHT (93.73% , $p \leq 0.01$). D'autre part L'E.Br et l'E.EtA présentent une activité antioxydante considérable avec un pourcentage de $76.70 \pm 1.25\%$ et $73.2 \pm 2.65\%$, respectivement (Fig. 24).

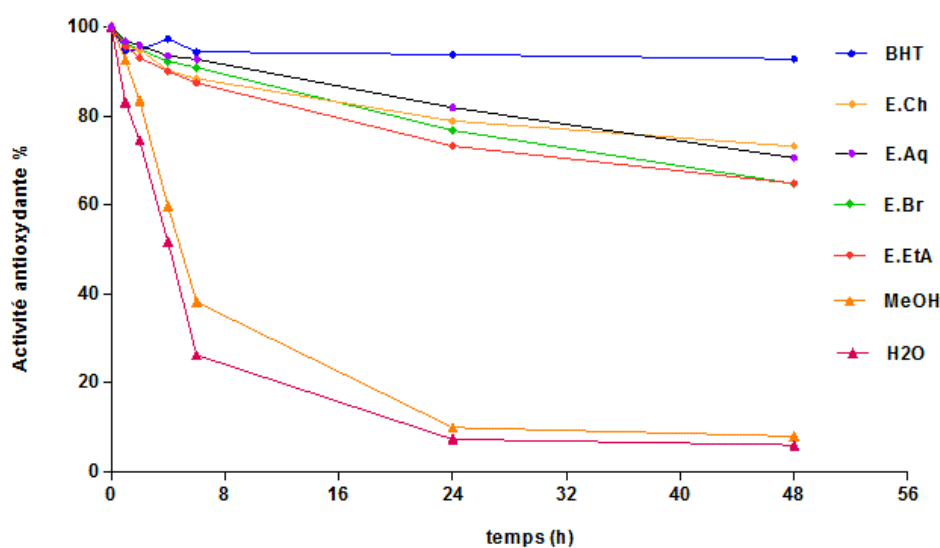


Fig. 23: Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en présence des extraits et BHT (chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

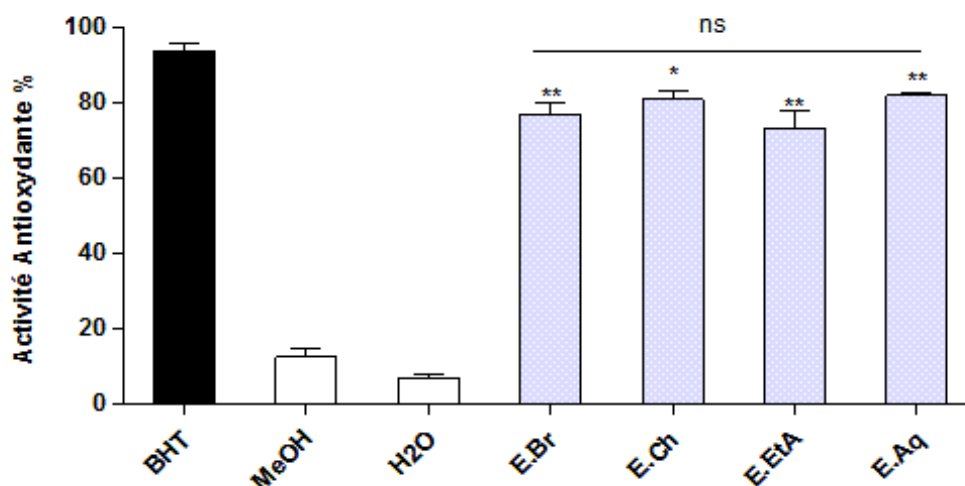


Fig. 24: Activité antioxydante relative des extraits et des standards (24 h) dans le système β -carotène/acide linoléique. (Les valeurs sont des moyennes \pm SD, $n=3$. ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

D'après les résultats obtenus, il y a une faible corrélation entre l'inhibition de l'auto-oxydation couplée de l'acide linoléique et les teneurs des extraits en polyphénols ($R^2= 0.5310$). Cela a montré que non seulement la quantité des composés phénoliques qui influent sur l'inhibition du blanchiment du β -carotène, mais aussi leur nature structurale (Altemimi *et al.*, 2017). En fait, certains auteurs ont signalé qu'une synergie possible entre les composés polyphénoliques et les autres composants présents dans les extraits pourrait contribuer à son activité antioxydante globale (Nur Arina et Azrina, 2016). Nos résultats concordent avec les études menées par Othman et ses collaborateurs (2014), qui ont montré qu'il existe une faible corrélation entre l'activité antioxydante basée sur le dosage de blanchissement du β -carotène et la teneur totale en composés phénoliques de quatre plantes locales malaisiennes. Etant donné que le test de blanchissement du β -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau. Les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène. Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène,

paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Aminjafari *et al.*, 2018; Misharina et Kiseleva, 2019).

3.8. Test de DPPH

Le test de DPPH est l'un des procédés les plus fréquemment utilisés parmi les tests antioxydants. Cette méthode est utile compte tenu de sa grande reproductibilité, de la facilité de prise de mesures à la température ambiante sans risque de dégradation thermique, de son efficacité, de son coût relativement avantageux et de sa rapidité (Akar *et al.*, 2017). Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical libre, qui possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. La couleur violette bien caractéristique de la solution de DPPH. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire (Yeo et Shahidi, 2019). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu et la mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une réduction des radicaux DPPH, mesurable par un spectrophotomètre à 517 nm (Sirivibulkovit *et al.*, 2018).

Les résultats montrent que tous les extraits de *T. pallidus* possèdent une activité anti-radicalaire vis-à-vis le radical DPPH mais avec une différence significative entre eux et entre les standards. L'activité anti-radicalaire est estimée par la valeur EC₅₀ qui se lie à la capacité antioxydante. La CE₅₀ d'un extrait est inversement proportionnelle à sa capacité antioxydante, car elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire la concentration de DPPH à 50% (Oliveira *et al.*, 2016; Moldovan *et al.*, 2017). E.EtA présente une activité anti-radicalaire plus élevée que les autres extraits et même le BHT (EC₅₀=12.25±0.11 µg/ml). E.Br et E.Ch ont presque la même activité anti-radicalaire (EC₅₀=18.46±0.10 µg/ml, 19.24±0.5 µg/ml, respectivement). Alors que l'extrait aqueux présente une faible activité avec une EC₅₀=54.5±0.26 µg/ml (**Fig. 25**).

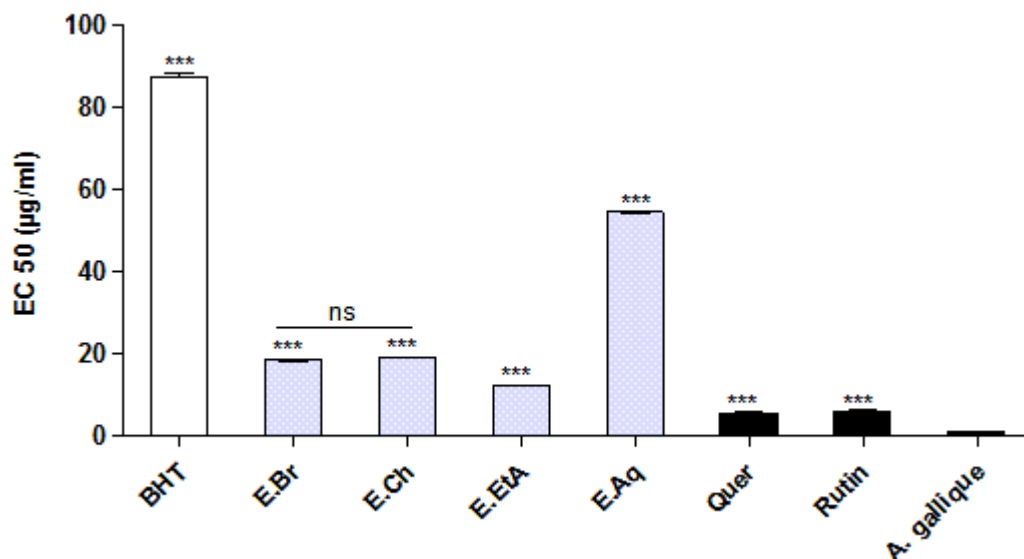


Fig. 25: Activité antiradicalaires des extraits et des standards par le test DPPH exprimé en valeurs EC₅₀. (Les valeurs sont des moyennes±SD, n=3; ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

Les résultats ont montré que tous les extraits ont présente une activité de balayage efficace contre le radical DPPH avec une moyenne corrélation entre cette l'activité et la teneur en polyphenols de ces extraits ($R^2=0.7065$). En effet, la présente étude exhibe une différence dans l'ordre d'activité anti-radicalaire des extraits (E.Br, E.Ch et E.Aq) et confirme l'efficacité d'E.EtA. Ceci reflète une différence dans le mécanisme anti-radicalaire dans les deux tests et les influences à la fois de la concentration d'antioxydant et la durée de réaction sur l'inhibition de cation (Santos *et al.*, 2019).

En conclure que la différence dans le comportement des extraits dans les essais de piégeage des radicaux libres peut être expliquée par les différents mécanismes chimiques impliqués dans les tests et les propriétés chimiques différentes des radicaux, dont le potentiel de réduction d'électrons par rapport aux composés dans les extraits sont différents (Amorati et Valgimigli, 2018). En d'autres termes, plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction comme le système radicalaire utilisé pour l'évaluation antioxydant, la stœchiométrie, le temps des réactions, rapport antioxydant/le radical, type de solvants, pH et le profil phénolique (Abramovic *et al.*, 2017). Le piégeage des radicaux libres

par des antioxydants est tributaire de deux mécanismes ; La libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) et la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycolyses et des anthocyanes). Dans le cas des composés phénoliques, le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors il se transforme en une molécule stable DPPH (Mathew S *et al.*, 2015). De tels résultats permettent de suggérer que l'activité de balayage de l'efficacité pourrait être liée non seulement aux contenus des polyphénols et des flavonoïdes de l'extrait, mais aussi à la structure de ces composés. (Foti, 2015; Chedea et Pop, 2019).

4. Etude de la toxicité

Le taux de mortalité dans un délai de 24 h. La dose létale 50 (DL₅₀) est la dose d'une substance chimique, administrée aux souris, qui provoque la mort de la moitié d'entre eux; elle peut être déterminée selon plusieurs méthodes. La DL₅₀ permet de mesurer la toxicité d'une substance et d'établir des classes de toxicité. En général, plus la DL₅₀ est petite, plus la substance est toxique (Erhirhie *et al.*, 2018).

La toxicité de l'E.Br et l'E.EtA a été estimée avec des doses graduées de 50 jusqu'à une dose de 2000 mg/kg. Les résultats n'ont produit aucun signe visible de toxicité aiguë ou de mort instantanée chez les souris traitées pendant toute la période expérimentale (**Tableau 5**).

Tableau 5: Etude de toxicité de l'E.Br et E.EtA

Doses (mg/kg)	Nombre d'animaux	Nombre d'animaux morts	Différence de dose (a)	Mortalité (b)	Probit (a×b)
50	6	0	/	0	/
200	6	0	150	0	/
500	6	0	300	0	/
1000	6	0	500	0	/
2000	6	0	1000	.0	/

En ce qui concerne la toxicité, aucun décès n'a été enregistré pendant la période de traitement, que ce soit dans les groupes témoins ou traités. Les animaux n'ont montré aucun changement dans le comportement général ou d'autres activités physiologiques.

Les essais de toxicité orale ont porté sur la détermination immédiate de la dose qui tue la moitié des animaux (dose létale médiane ou DL₅₀), le moment de la létalité après une exposition à une substance toxique, ainsi que sur l'observation du début, de la nature, de la gravité et de la toxicité (Subramanian *et al.*, 2018). Cependant, récemment, après l'observation immédiate, les paramètres toxicologiques (biochimiques et histopathologiques) permettant d'évaluer les effets indésirables potentiels sont choisis et mesurés avec soin. La dose unique fixe, pour laquelle des signes de toxicité, mais aucun décès n'est détecté, est utilisée pour classer les composés testés en fonction de leur potentiel toxique (Sachana et Hargreaves, 2018).

4.2. Paramètres biochimiques

L'évaluation toxicologique de toute plante médicinale a pour objectif principal d'identifier les effets néfastes pouvant être associés à son utilisation et de déterminer les limites d'exposition auxquels de tels effets se produisent, évitant ainsi les éventuels effets néfastes en cas d'utilisation en tant que médicament (Subramanian *et al.*, 2018). Le foie et les reins sont des organes très sensibles aux substances toxiques et peuvent constituer un indice important de l'état physiologique et pathologique des animaux et des humains (Assi *et al.*, 2016). Les résultats ont démontré que les extraits (E.Br et E.EtA) de *T. pallidus* n'induisaient aucun dommage au niveau du foie et des reins et avaient été confirmés plus tôt par les paramètres biochimiques. Le profil biochimique des groupes traités et le groupe témoin montre que aucune différence significative ($p > 0,05$) dans les paramètres biochimiques entre les groupes traités et le groupe témoin (**Tableau 6**). Les transaminases (AST et ALT) et la phosphatase alcaline (ALP) sont des enzymes métaboliques importantes dans les cellules hépatiques, sont

libérés dans le sang lorsque les cellules du foie sont endommagées. Pour cela, une augmentation des taux sanguins de ces enzymes serve comme une indication d'une lésion hépatique (Contreras et Hernández, 2016; Olayode *et al.*, 2019). Les reins sont très sensibles aux substances toxiques pour deux raisons; un volume important de sang y circule et sa capacité à filtrer de grandes quantités de toxines qui peuvent se concentrer dans les tubules rénaux. Encore une fois, l'élévation de l'urée et de la créatinine est également de bon indicateur pour les troubles rénaux (Makris et Spanou, 2016). Un taux élevé de protéine totale (l'albumine et la globuline) dans le sang indique une altération des fonctions hépatique et rénale et des risques de contracter une infection (Bilancio *et al.*, 2019).

Tableau 6: Paramètres biochimiques chez des souris traitées avec l'E.Br et l'E.EtA de *T. pallidus*. Les valeurs sont des moyennes±SEM, n=8. ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$. †: $p \leq 0,05$.

Paramètres	Groupe de control	Groupes traités (2000 mg/kg)	
		E.Br	E.EtA
Glucose (g/L)	1.62±0.05	1.66±0.03 ^{ns}	1.45±0.05 ^{ns}
Urée (g/L)	0.41±0.02	0.43±0.03 ^{ns}	0.44±0.05 ^{ns}
Créatinine (mg/L)	4.74±0.31	4.87±0.43 ^{ns}	4.76±0.29 ^{ns}
Cholestérol (g/L)	1.03±0.05	0.87±0.01 [*]	0.93±0.07 ^{ns}
Triglycérides (g/L)	0.92±0.08	1.02±0.04 ^{ns}	1.03±0.20 ^{ns}
ALT (U/l)	39.14±4.07	38.75±5.66 ^{ns}	38.00±3.51 ^{ns}
AST (U/l)	202.28±4.50	167.00±15.79 ^{**}	213.00±26.85 ^{ns}
ALP (U/L)	114.28±17.53	110.2±14.65 ^{ns}	158.66±10.58 [†]

La médecine thérapeutique naturelle est devenue universellement populaire dans les soins de santé primaires, en particulier dans les pays en développement. L'utilisation appropriée de plantes médicinales dans la supplémentation alimentaire est très importante pour le maintien de la santé (Subramanian *et al.*, 2018). De nombreuses études ont rapporté les effets néfastes d'une utilisation inappropriée de plantes médicinales. Par conséquent, l'évaluation des effets toxicologiques de tout extrait de plante médicinale destiné à être utilisé chez l'animal ou chez

l'homme est un élément crucial de son évaluation des effets toxiques potentiels (Bourhia *et al.*, 2019).

5. Etude *in vivo* de l'activité antioxydante des extraits

5.1. Capacité antioxydante totale du sang

L'effet du traitement des souris par l'E.Br et l'E.EtA (500 mg/kg) pendant trois semaines sur l'hémolyse des globules rouges a été évalué. D'après les résultats, le traitement n'a pas augmenté ($p > 0,05$) les valeurs d'HT₅₀ par rapport au groupe témoin. Le HT₅₀ obtenu n'a révélé aucune extension significative dans tous les groupes traités. L'administration orale de E.Br, E.EtA ou Vit.C n'a pas augmenté le temps hémolytique (HT₅₀= 122,4±4,12; 109,55±3,16 et 118,32±5,7 min, respectivement) par rapport au groupe témoin (HT₅₀= 111,95±3,4 min) (**Fig. 26**). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Baghiani *et al.*, (2013).

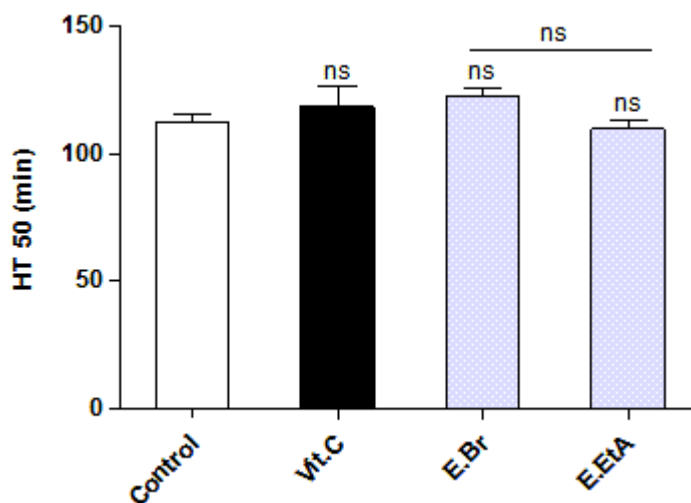


Fig. 26: Activité anti hémolytique de différents groupe traits et groupe témoin (Les valeurs sont les moyennes±SEM, n=8. Les comparaisons sont faites par rapport au groupe témoin, ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, * ** : $p \leq 0,001$).

Plusieurs études ont rapportées que les flavonols et leurs glycosides sont des antioxydants efficaces protégeant les globules rouges humains et que l'activité antioxydante de ces flavonoïdes dépend de manière significative de la structure des molécules (Afsar *et al.*, 2016;

Panche *et al.*, 2016). L'effet protecteur des flavonoïdes de l'hémolyse oxydative induite par les radicaux libres peut être lié à leur effet sur la liaison de la peroxydation des lipides et de l'oxydation des protéines à la membrane BRC et leur capacité à pénétrer les bicouches lipidiques (Castro *et al.*, 2018). En effet, plusieurs chercheurs ont signalé que les flavonoïdes sont des antioxydants très puissants qui peuvent protéger les cellules des globules rouges et inhibent très efficacement l'hémolyse oxydative induite par les radicaux libres. Il a également été montré aussi que l'effet protecteur des flavonoïdes peut être lié à leur fixation à la membrane plasmique et leur capacité de pénétrer dans la bicouche lipidique. Ils inhibent donc de manière significative la peroxydation des lipides et favorisent leur intégrité contre la lyse (Feyisayo *et al.*, 2015; Tantary *et al.*, 2017).

5.2. Activité de la catalase tissulaire

L'antioxydant enzymatique CAT catalyse la réduction des peroxydes d'hydrogène et protège les tissus contre les radicaux hydroxyles réactifs (Ighodaro et Akinloye, 2018). Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait brut et l'E.EtA (500 mg/kg) à des souris induisait une augmentation significative ($P < 0,001$) de l'activité CAT du foie et des reins chez les souris mâles (**Fig. 27**), par contre aucune différence significative n'a été observée dans les activités de CAT dans le cerveau. Les effets protecteurs des flavonoïdes dans les systèmes biologiques sont attribués à leur capacité à piéger les radicaux libres, à réduire la puissance, à chélater les métaux et à activer les enzymes antioxydantes (Hu *et al.*, 2019). Plusieurs études montrent que l'administration des extraits riche en polyphénols augmente significativement l'activité des enzymes antioxydantes, notamment la SOD, la catalase et la glutathion peroxydase (Mossa *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2017; Quan *et al.*, 2018).

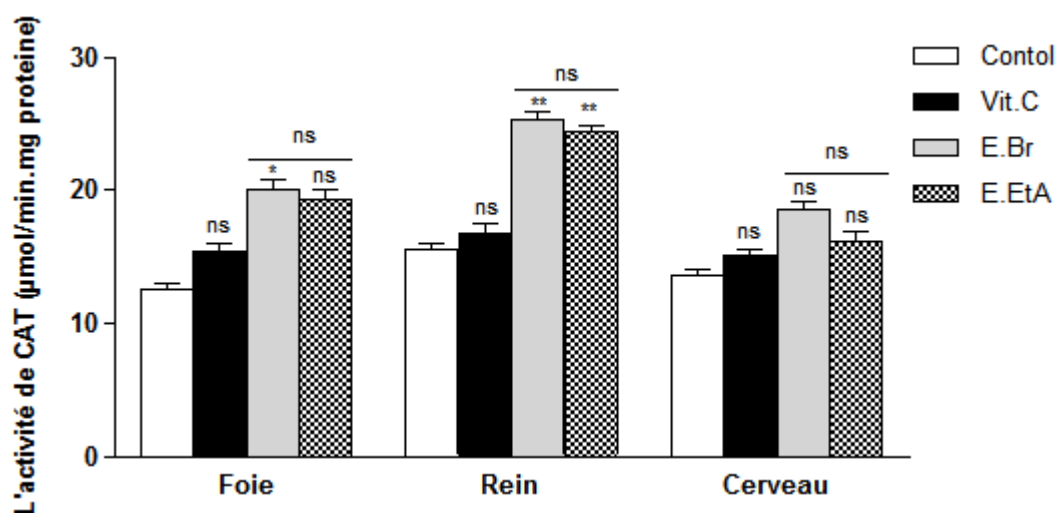


Fig. 27: Activité de la catalase tissulaire dans les différents groupes (les valeurs sont les moyennes \pm SEM, n = 8. Les comparaisons sont faites par rapport au groupe témoin, ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

5.3. Dosage de la glutathion tissulaire

Le glutathion (GSH) est un antioxydant cellulaire important, non enzymatique. Il joue un rôle majeur dans la protection des cellules contre le stress oxydatif. Il constitue une première ligne de défense significative contre les ROS et le stress oxydatif et joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité des cellules (Ighodaro et Akinloye, 2018; Benhar, 2018). La quantité de GSH présente dans le tissu a été exprimé en nmol/g de tissu. Les résultats ont montré que l'administration orale de E.Br et E.EtA (500 mg/kg) a augmenté significativement ($P \leq 0,01$) les niveaux de glutathion par rapport aux animaux témoins avec des pourcentages différents (54,40%, 78,19% et 115,53% dans le foie, rein et cerveau respectivement) pour l'E.Br et (41,30%, 63,40% et 102,27% dans le foie, les reins et le cerveau respectivement) pour l'E.EtA (**Fig. 28**). Le GSH réduit est un antioxydant biologique non enzymatique principalement présent dans le foie. Il protège les protéines cellulaires contre les espèces réactives de l'oxygène. De plus, le GSH contribue au maintien de l'activité antioxydante d'autres enzymes antioxydantes, telles que la glutathion peroxydase, ainsi que la vit. C et la vit. E. À cet égard, une concentration accrue de GSH implique une augmentation de la capacité antioxydante et une réduction de la peroxydation des lipides membranaires (Gaucher

et al., 2018). Par conséquent, une telle augmentation significative du niveau de GSH était probablement due à une amélioration du statut de GSH qui pourrait être provoquée par les constituants des extraits (polyphénols totaux et les flavonoïdes). Ces phytochimiques aurait pu augmenter la biosynthèse des antioxydants cellulaires, en particulier le GSH (Lee *et al.*, 2017; Goodla *et al.*, 2019).

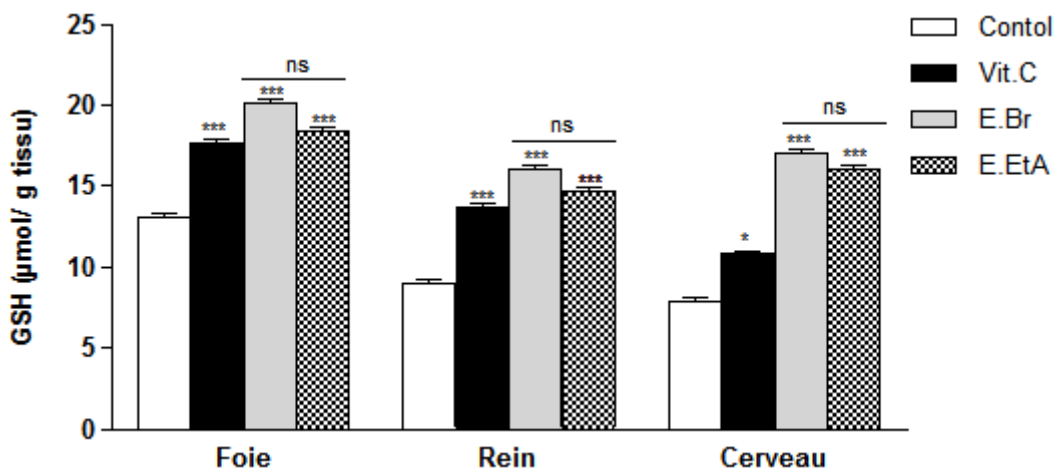


Fig. 28: Teneur en glutathion réduit (GSH) dans différent groupes (Les valeurs sont moyennes \pm SEM, n=8. Les comparaisons sont faites par rapport au groupe témoin, ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

5.4. Estimation de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est une altération oxydative d'acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires qui génère un certain nombre de produits de dégradation, entraînant un stress oxydatif (Zielinski et Pratt, 2017). Par conséquent, la mesure de la peroxydation des lipides est un indicateur important dans l'évaluation du potentiel antioxydant. Le MDA, qui est un produit final de la peroxydation des lipides, est également l'un des biomarqueurs les plus fréquemment utilisés pour évaluer l'activité antioxydante *in vivo* (Okaiyeto *et al.*, 2018; Katerji *et al.*, 2019).

Les résultats obtenus indiquent clairement une diminution significative du taux de MDA et de l'inhibition de la peroxydation des lipides dans les homogénats de foie, de reins et de cerveau des animaux traités (**Fig. 29**). Tandis que, l'administration orale de E.Br (500 mg/kg) a

diminuée significativement ($P \leq 0.01$) le taux de peroxydation lipidique par rapport aux animaux témoins avec des pourcentages différents (26.09%, 21.04% et 50.62% dans le foie, reins et cerveau respectivement). D'plus, l'administration orale de E.EtA (500 mg/kg) a diminuée significativement ($P \leq 0.05$) le taux de peroxydation lipidique par rapport aux animaux témoins avec des pourcentages différents (12.40%, 18.04% et 23.62% dans le foie, reins et cerveau respectivement). Plusieurs études ont évalué les relations entre l'activité antioxydante des produits végétaux et leur teneur en composés phénoliques (Lin *et al.*, 2016; Okaiyeto *et al.*, 2018). De plus, Ajaghaku et ces collaborateurs (2017) montrent que l'administration de l'extrait d'éthyle acétate de *Alchornea floribunda* à dose 400 mg/kg diminue significativement le taux de peroxydation lipidique.

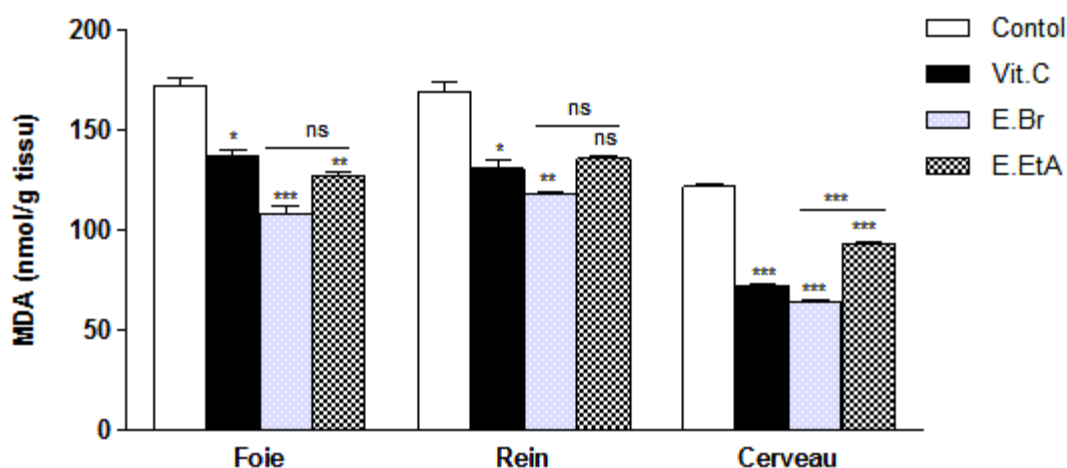


Fig. 29: Profil de la peroxydation lipidique dans les différents groupes (Les valeurs sont les moyennes \pm SEM, $n = 8$. Les comparaisons sont faites par rapport au groupe témoin, ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

5.5. Pouvoir réducteur plasmatique

Le pouvoir réducteur du plasma a été évalué selon Maazoun *et al.*, (2018). C'est un test colorimétrique qui mesure la capacité du plasma à réduire le Fe^{+3} intense. Les résultats indiquent que le traitement des souris par la Vit.C, l'E.Br et l'E.EtA (500 mg/kg) augmente la réduction potentielle du plasma chez ces animaux par rapport au groupe témoin. Ainsi, le système de défense antioxydant semble être amélioré dans le plasma. Les résultats ont montré

que l'administration orale de E.Br et E.EtA (500 mg/kg) améliore significativement ($P \leq 0,01$) le pouvoir réducteur du plasma par rapport aux animaux témoins avec des pourcentages différents 51.15%, et 32.12%, pour l'E.Br et l'E.EtA respectivement (**Fig. 30**). De nombreuses études ont utilisé un test de puissance réductrice ferrique afin d'évaluer la capacité antioxydante du plasma chez les animaux traités (Pohanka, 2017). Baghiani *et al.* (2013) ont rapporté que l'administration orale d'extraits d'*Anchusa azurea* et de *Sedum sediforme* (25-200 mg/kg) pendant deux à trois semaines a conduit à une augmentation significative du pouvoir réducteur du fer. Il a été rapporté que l'administration orale des extraits de plantes riches induit une augmentation dans le pouvoir réducteur ferrique du plasma des animaux traités (Chen *et al.*, 2015; Kumari *et al.*, 2016). Les polyphénols possèdent le pouvoir réducteur le plus élevé, la présence de composés phénoliques et de flavonoïdes dans les extraits aurait contribué à l'augmentation du pouvoir réducteur plasmatique.

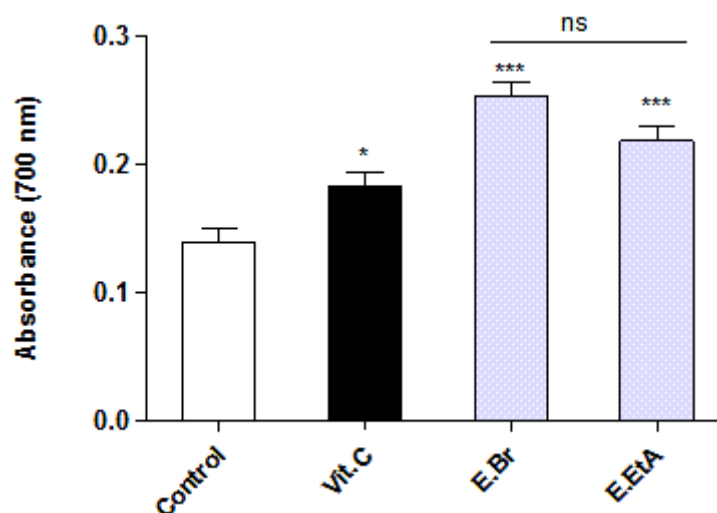


Fig. 30: Pouvoir réducteur du plasma chez les souris traitées par des extraits de *T. pallidus*. (Les valeurs sont des moyennes \pm SEM $n = 8$, les comparaisons sont faites par rapport au groupe témoin, ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, ***: $p \leq 0,001$).

5.6. Capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis le radical DPPH

Le test de piégeage des radicaux libres DPPH est la méthode la plus utilisée pour évaluer l'activité antioxydante de la substance (Chedea et Pop, 2019). Les activités antioxydantes de

l'E.Br et l'E.EtA ont été déterminées *in vivo*, grâce à la capacité du plasma de souris traitées par ces extraits à piéger le radical DPPH. Les résultats ont montré que le traitement de souris avec l'E.EtA et la vit. C pendant trois semaines conduites à une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du potentiel de piégeage du DPPH plasmatique ($15.21 \pm 0.8\%$ et $14.37 \pm 1,1\%$, respectivement) par rapport au groupe témoin ($11.56 \pm 1.2\%$) (**Fig. 31**). Cependant, le traitement des souris avec l'E.Br n'a montré aucune augmentation significative ($p > 0,05$) du potentiel de piégeage du DPPH plasmatique ($13.47 \pm 0.9\%$). Il semble que l'augmentation de l'antioxydant plasmatique soit probablement attribuée à des niveaux élevés d'antioxydants exogènes tels que l'acide ascorbique, les composés phénoliques, les caroténoïdes et les flavonoïdes. Cependant, de nombreuses études ont été rapportées sur la relation entre les polyphénols et les classes de flavonoïdes et leur biodisponibilité dans le plasma (Chen *et al.*, 2015).

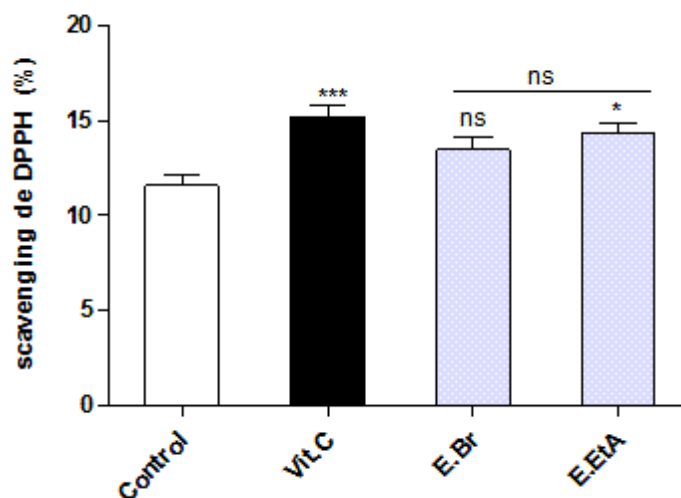


Fig. 31: Potentiel antioxydant du plasma, chez des souris traitées par les extraits de *T. pallidus*, par test le test DPPH. (Les valeurs sont des moyennes \pm SEM, $n=8$. Les comparaisons sont faites par rapport au groupe témoin ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, ***: $p \leq 0,001$).

Les résultats obtenus montrent que le traitement des souris par les extraits de *T. pallidus* améliore significativement la capacité antioxydante plasmatique totale. Cependant, le comportement de ces extraits contre l'attaque radicalaire est toujours difficile à expliquer car

le sang est une matrice complexe dans laquelle les substances pharmacologiques évaluées pourraient être impliquées dans de nombreuses réactions dans le cytoplasme cellulaire, la membrane cellulaire et/ou au niveau extracellulaire (plasma) (Olivero-David *et al.*, 2018; Agustí *et al.*, 2017). Un autre facteur est la courte demi-vie des polyphénols dans le plasma, qui est généralement de l'ordre de quelques heures. En plus d'une mauvaise absorption, les polyphénols et en particulier les flavonoïdes sont largement métabolisés dans le foie et l'intestin lorsqu'ils sont ingérés (Cvejić *et al.*, 2017). En outre, il a été démontré que le degré de glycosylation et le type de sucre affectent la biodisponibilité des flavonoïdes par rapport à leur homologue aglycone (Minatel *et al.*, 2016; Williamson *et al.*, 2018). Cependant, la biodisponibilité des flavonoïdes en raison de la très large gamme et de la variabilité en termes de structure au sein de chaque groupe, il est difficile de généraliser l'absorbabilité des flavonoïdes uniquement en fonction du groupe auquel ils appartiennent. Les valeurs vont de 0,3% à 43% l'apport, qui démontre la grande variabilité de la biodisponibilité des différents polyphénols (Chen *et al.*, 2015).

6. Activité hépatoprotectrice

Les maladies du foie telles que l'hépatite, la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire constituent l'un des principaux problèmes de santé dans le monde. De nombreuses affections telles qu'une nutrition inadéquate, une infection virale, l'abus d'éthanol et de médicaments, l'exposition aux xénobiotiques et les maladies métaboliques ont été impliquées dans le développement et la progression des maladies du foie (Homma et Fujii, 2019; Ramachandran et Jaeschke, 2019). Plusieurs facteurs, notamment la peroxydation des lipides, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), les facteurs du complément et les médiateurs pro-inflammatoires, tels que les cytokines et les chimiokines, sont impliqués dans les maladies hépatiques. L'hépatotoxicité induite par CCl_4 est largement connue et a été largement utilisée dans les modèles expérimentaux pour comprendre les mécanismes cellulaires

derrière l'endommagement oxydatif et évaluer le potentiel thérapeutique des médicaments et antioxydants alimentaires (Dutta *et al.*, 2018; McGill et Jaeschke, 2019). L'activité hépatoprotectrice de l'extrait brut (E.Br) contre l'hépatotoxicité expérimentale induite par CCl₄ a été évaluée selon la méthode de Al-Seeni *et al.* (2016).

6.1. Détermination des paramètres biochimiques/sérique

La présente étude montre que ALT, AST, ALP et le taux de BT sont plus élevés dans le groupe CCl₄ (II) que dans le groupe témoin (I) ($p \leq 0,001$) (**Fig. 32**). Les résultats obtenus montrent que, le traitement des souris par extrait de *T. pallidus* (500 mg/kg) protège significativement ($p \leq 0.01$) le foie contre l'hépatotoxicité induite par le CCl₄, et il a entraîné une diminution significativement ($p \leq 0.01$) dans l'activité enzymatique de AST, ALT et PAL (**Fig. 32**). Par contre le traitement des souris par extrait de *T. pallidus* (100 et 250 mg/kg) ne protège pas significativement ($p \leq 0.05$) le foie contre l'hépatotoxicité induite par le CCl₄.

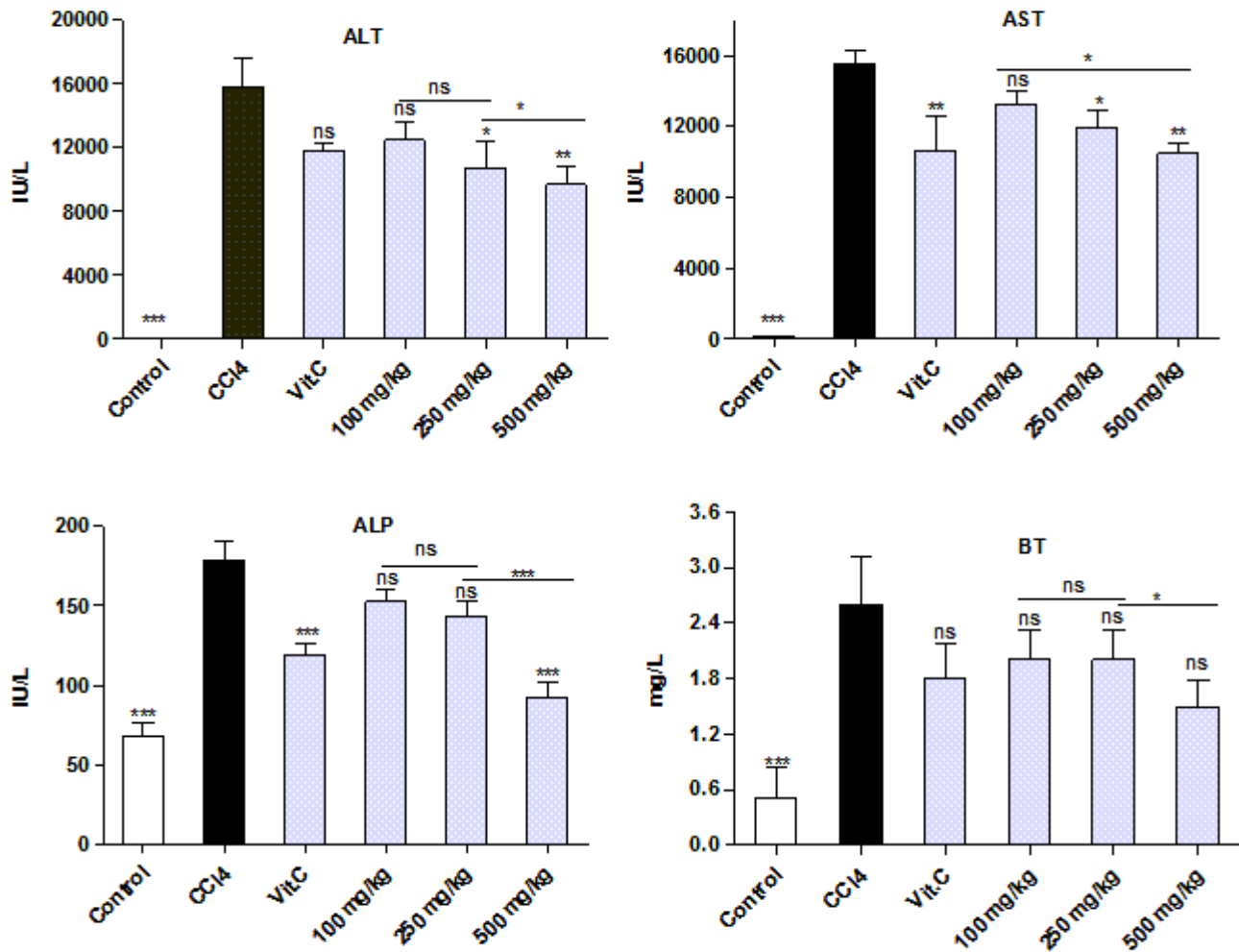


Fig. 32 : Les paramètres biochimiques de souris traitées par l'extrait méthanolique et vit. C dans l'hépatotoxicité induite par CCl₄. ALT: alanine aminotransférase; AST: aspartate aminotransférase; ALP: phosphatase alcaline; TB: bilirubine totale. (Les valeurs sont les moyennes±SEM, n=8. Les comparaisons sont faites par rapport au groupe CCl₄, ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

6.2. Activité de la catalase tissulaire

Le SOD et le CAT ont des fonctions importantes dans les mécanismes de défense contre les effets nocifs des espèces réactives de l'oxygène et radicaux libres. L'estimation de l'activité de CAT permet de déterminer l'état de stress des systèmes biologiques (Ighodaro et Akinloye, 2018). Les résultats montrent une diminution de l'activité du CAT dans le foie des souris traitées par CCl₄. Cependant les souris traitées par l'extrait méthanolique à des doses de 250

et 500 mg/kg exhibent une augmentation significative ($P < 0,01$) de l'activité CAT (220%) par rapport au témoin (Fig. 33).

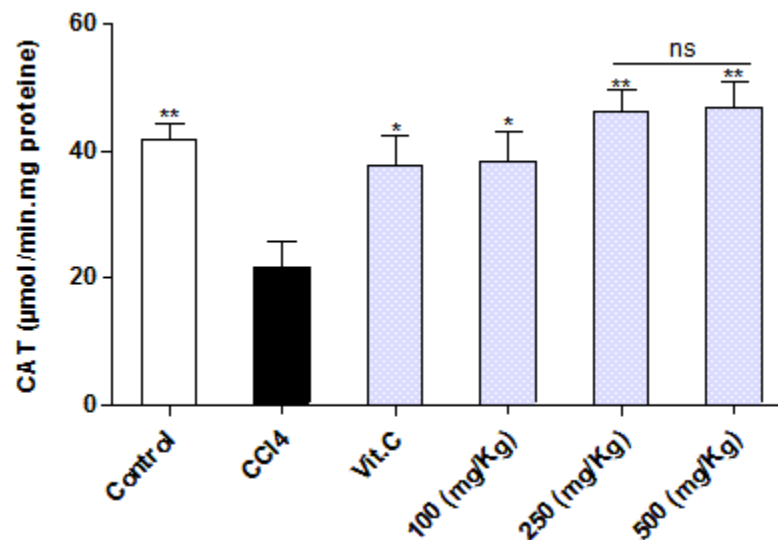


Fig. 33 : Activité de la catalase hépatique des souris traitées par l'extrait méthanolique et vit. C dans l'hépatotoxicité induite par CCl₄. (Les valeurs sont les moyennes ± SEM, n = 8. Les comparaisons sont faites par rapport au groupe CCl₄, ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

6.3. Dosage du glutathion tissulaire

Le glutathion (GSH) est un antioxydant cellulaire important, il joue un rôle majeur dans la protection des cellules contre le stress oxydatif (Gaucher *et al.*, 2018; Ighodaro et Akinloye, 2018). La réduction de la concentration intracellulaire de GSH dans le foie des souris traitées par CCl₄ indique des dommages dans cellules hépatiques. Les résultats ont révélé que, l'administration de l'extrait brut de *T. pallidus* à dose de 500 mg/kg induisait une augmentation significative ($p \leq 0,05$) dans la teneur en GSH. Cependant, l'administration de l'extrait brut de *T. pallidus* à dose de 100 et 250 mg/kg ne présente aucun effet sur la teneur en GSH dans le foie des souris traitées par CCl₄ (Fig. 34).

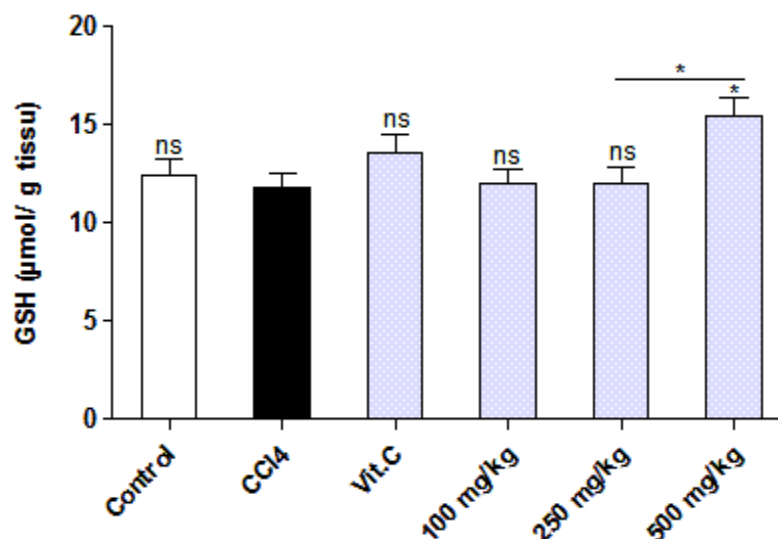


Fig. 34 : Teneur en glutathion réduit (GSH) hépatique des souris traitées par l'extrait méthanolique et vit. C dans l'hépatotoxicité induite par CCl₄. (Les valeurs sont les moyennes±SEM, n = 8. Les comparaisons sont faites par rapport au groupe CCl₄, ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

6.4. Estimation de la peroxydation lipidique

Le MDA un des produits terminaux formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés méditée par les radicaux libres, il est également l'un des biomarqueurs les plus fréquemment utilisés pour évaluer l'activité antioxydante *in vivo* (Khoubnasabjafari *et al.*, 2016; Reddy *et al.*, 2017; Ito *et al.*, 2019). Selon les résultats obtenus, l'administration de l'extrait brut de *T. pallidus* à dose de 100, 250 et 500 mg/kg indiquent clairement une diminution significative ($p \leq 0,001$) du taux de MDA dans le foie des souris traitées par CCl₄ (**Fig. 35**). La diminution du taux de MDA signifie l'inhibition de la peroxydation des lipides dans le foie des animaux traités par des extraits de plantes (Chiu *et al.*, 2018; Zhang Y *et al.*, 2018; Araya *et al.*, 2019).

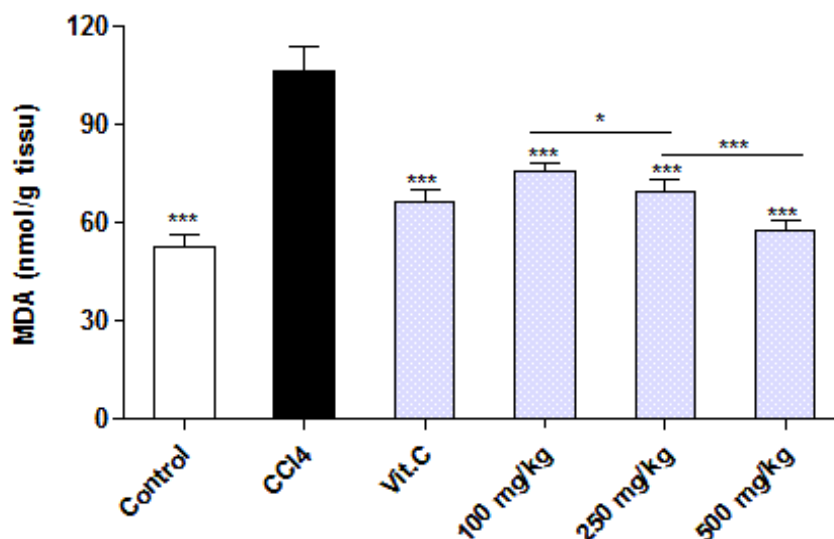


Fig. 35: Profile de la peroxydation lipidique hépatique des souris traitées par l'extrait méthanolique et vit. C dans l'hépatotoxicité induite par CCl₄. (Les valeurs sont les moyennes±SEM, n = 8. Les comparaisons sont faites par rapport au groupe CCl₄, ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

Le modèle d'hépatotoxicité induite par CCl₄ est largement utilisé dans l'évaluation des effets antioxydants des médicaments et des extraits des plantes (Muriel *et al.*, 2017; McGill et Jaeschke, 2019). Le métabolisme de CCl₄ commence par la formation des radicaux libres trichlorométhyl et proxy chlorométhyl via l'activité du système oxygénase du cytochrome P450 dans le réticulum endoplasmique. Le radical trichlorométhyle réagit avec diverses substances biologiques importantes telles que les acides gras, les protéines, les lipides, les acides nucléiques et les acides aminés (Takahashi et Fukusato, 2017). En outre il était évident que plusieurs phytoconstituants ont la capacité d'induire des enzymes microsomaux soit en accélérant l'excrétion de CCl₄ ou par inhibition de la peroxydation lipidique induite par CCl₄. Les phytoconstituants comme les flavonoïdes et les triterpénoïdes sont connus par leur activité hépatoprotectrice (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2016; Saha *et al.*, 2019). L'activité antioxydante est une voie importante pour les effets hépatoprotecteurs (Abdu et Al-Bogami, 2017). En conséquence, des antioxydants ont été proposés comme traitement d'appoint pour diverses maladies du foie (Lozano *et al.*, 2019; Singal et Shah, 2019). Certains produits

naturels ayant une activité antioxydante ont été prouvés avoir de bons effets hépatoprotecteurs (Hellerbrand *et al.*, 2017). Les dommages aux cellules hépatiques se traduisent par une augmentation des taux d'enzymes hépatospécifiques cytoplasmiques qui sont libérés à la suite d'une lésion cellulaire. Dans la toxicité induite par le tetrachlorure de carbone, ce dernier est métabolisé par le système de cytochrome P450 monooxygénase pour produire le radical trichlorométhyl, qui réagit ensuite avec l'oxygène pour former le radical trichlorométhylperoxyde (Scholten *et al.*, 2015). Ces radicaux attaquent en outre les macromolécules cellulaires, telles que les protéines et les lipides, conduisant ainsi à la peroxydation lipidique et la nécrose cellulaire dans certaines parties du foie. L'ALT, l'AST et l'ALP sont libérés dans le sang lorsque les cellules du foie sont endommagées. Le taux de BT dans le sérum sanguin peut refléter l'étendue de la lésion hépatique (Te, 2019). De même, Zamzami *et al.* (2019) ont rapporté que CCl₄ induit des augmentations significatives des niveaux d'enzymes cytoplasmiques (ALT et AST), ce qui suggère l'étendue des dommages au foie. Dans cette étude, le traitement des souris avec l'extrait brut de *T. pallidus* (500 mg/kg) protège le tissu hépatique contre les dommages induits par le CCl₄, cette protection manifeste dans la diminution d'activités de ALT, AST et ALP par rapport au groupe de CCl₄. La réduction de la concentration intracellulaire de GSH dans le foie des souris traitées par CCl₄ indique des dommages aux cellules hépatiques. La peroxydation lipidique est étroitement liée aux maladies humaines incluant une lésion hépatique (Ramachandran et Jaeschke, 2018; Ito *et al.*, 2019). Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique de *T. pallidus* à dose de 500 mg/kg entraîne une diminution significative de MDA et une augmentation dans l'activité de CAT et le taux de GSH, ceux-ci suggèrent que l'extrait méthanolique peut avoir une activité antioxydante *in vivo* et hépatoprotectrice contre l'hépatotoxicité induite par CCl₄.

L'acide rosmarinique (AR) est un composé phénolique naturel (Alagawany *et al.*, 2017), principalement présent dans la famille des Lamiacées, composé de plusieurs plantes médicinales, herbes et épices (Berdowska *et al.*, 2013; Vallverdú-Queralt *et al.*, 2014; Yoo *et*

al., 2019), et principalement présent dans les espèces de *Thymus* (Pereira *et al.*, 2013, 2016; Rtibi *et al.*, 2019). Il a été démontré que l'acide rosmarinique possède de nombreuses activités biologiques, notamment les propriétés antioxydantes comme inhibiteur de ROS et inhibiteur de la peroxydation lipidique (Hahn *et al.*, 2017), antidiabétique (Jayanthi et Subramanian, 2014; Ngo et Chua, 2018), anti-inflammatoire (Cao *et al.*, 2016; Gautam *et al.*, 2019), effet antibactérien (Bittner *et al.*, 2019), neuroprotecteur (Khamse *et al.*, 2015) et hépatoprotecteur (Hasanein et Sharifi, 2017).

Notre étude a confirmé pour la première fois la présence des composés supplémentaires pour les espèces de *Thymus*, y compris l'acide hydroxy-dihydrolithospermique, l'acide yunnaneique E, l'acide salvianolique A, E/B, l'acide sargerinique et l'acide malonyl. L'acide salvianolique, un dimère d'acide rosmarinique isolé de *Salvia officinalis*, ainsi que les acides salvianoliques A et B ont une forte activité de balayage des radicaux libres (Damašius *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2019). L'acide salvianolique A agit comme protecteur cardiovasculaire *in vivo* dans le modèle de blessure à la reperfusion d'ischémie d'un cœur de rat isolé (Ren *et al.*, 2019). L'acide salvianolique B est un constituant pertinent de *S. miltiorrhiza* et a présenté des activités de piégeage plus élevées que la vitamine C contre HO•, O₂•⁻, les radicaux DPPH et les radicaux ABTS (Sun *et al.*, 2009). L'alimentation par les extraits de *Salvia miltiorrhiza* présentent plusieurs activités biologiques tels que l'activité antibactérienne et anticancéreuse (Küçük *et al.*, 2019). En plus, Huang *et al.* (2015) montrent que l'administration d'acide salvianolique B isolé à partir *S. miltiorrhiza* a un effet protectif pour les souris contre le diabète type 2 induit par le streptozotocin. Les glycosides luteoline, apigénine et eriodictyol sont des flavonoïdes présents dans des espèces de *Thymus* et qui ont nombreuses activités antioxydantes, notamment le balayage des radicaux libres, l'inhibition des enzymes génèrent les ROS et l'inhibition de la peroxydation lipidique (Roby *et al.*, 2013; Msaada *et al.*, 2016). L'effet des extraits de *T. pallidus* sur les enzymes liées au syndrome métabolique peut être lié à la teneur en acide rosmarinique et leurs dérivés.

Conclusion

La phytothérapie représente l'un des domaines les plus importants de la médecine traditionnelle partout dans le monde. Il existe une tendance croissante à corréler les constituants phytochimiques des plantes avec ses activités pharmacologiques. De plus, les plantes médicinales et aromatiques sont considérées comme une source importante de nouveaux médicaments à cause de leur constituons précieux en molécules bioactives. De ce fait, cette étude a été menée sur *T. pallidus* Coss., plante médicinale de la pharmacopée Algérienne, qui n'a pas été étudiée auparavant, tant en termes de toxicité, que d'activités biologiques ou d'analyse phytochimique.

L'extraction des polyphénols des parties aériennes de la plante *T. pallidus* Coss. débute par un mélange hydro-alcoolique suivi par un fractionnement en utilisant de solvants de polarité croissante afin de séparer les composés phénoliques en diverses phases. Les résultats de l'analyse phytochimique des extraits de la plante étudiée ont montré que l'E.EtA est le plus riche en polyphénols totaux et flavonoïdes. De plus, l'analyse par HPLC-DAD-MS/MS a permis d'établir le profil chimique d'E.Br, E.EtA et E.Aq, dont 49 composés ont été identifiés dans les extraits par des méthodes spectrométriques. Les composés principaux étaient les acides hydroxybenzoïques, l'acide hydroxycinnamique, des oligomères d'acide hydroxycinnamique, des flavonoïdes et un dérivé de l'acide jasmonique.

En raison de la diversité des antioxydants et de la complexité du processus d'oxydation, les capacités antioxydantes des extraits de *T. pallidus* a été évaluée par plusieurs techniques *in vitro* ce qui permet de mieux comprendre leur potentiel antioxydant. Les résultats obtenus ont montré que l'E.EtA possède les activités antioxydantes les plus importantes, dont cet extrait a montré un effet de piégeage plus élevé contre le DPPH, ABTS et H₂O₂, une forte activité chélatrice et un pouvoir réducteur puissant. De plus, E.EtA présentait une puissante activité inhibitrice sur XO, ainsi qu'un effet protecteur plus important contre l'hémolyse des

érythrocytes induite par l'AAPH. Il est connu que les activités antioxydantes augmentent proportionnellement à la teneur en composés phénoliques. Ainsi, nos résultats ont montré qu'il y a une très bonne corrélation entre les activités antioxydantes des extraits et leurs teneurs en polyphénols et flavonoïdes. Cette relation était bien illustrée dans l'activité chélatrice, le pouvoir réducteur, le piégeage de H₂O₂ et l'activité ant-ihémolytique. Cependant, une corrélation modérée a été enregistrée pour l'oxydation du β-carotène et le piégeage du DPPH).

En ce qui concerne l'évaluation de la toxicité, cette étude fournit des données précieuses sur les profils de toxicité orale sub-aiguë des extraits *T. pallidus*, qui devraient être très utiles pour toute étude *in vivo* et clinique en future. Les résultats ont démontré que l'E.Br et l'E.EtA ne sont pas toxique, avec une DL₅₀ orale supérieure à 2000 mg/kg de poids corporel chez les souris.

Pour confirmer le potentiel antioxydant de l'E.Br et l'E.EtA, des propriétés antioxydantes *in vivo* ont été étudiées. Une approche a été réalisée en administrant à des souris mâles une dose de 500 mg/kg/jour pendant 21 jours. L'analyse des paramètres du potentiel antioxydant a révélé que cette administration augmentait considérablement le pouvoir réducteur plasmatique, le taux de GSH et diminuait le taux de MDA dans le foie et le cerveau. De plus cette administration a augmenté significativement l'activité de CAT dans les reins. Par ailleurs l'étude de l'effet hépatoprotecteur d'une supplémentation quotidienne de l'E.Br à des doses de 100, 250 et 500 mg/kg/jour chez les souris contre CCl₄ a montré que la dose 500 mg/kg a diminué significativement l'ALT, AST, ALP et MDA et a augmenté de CAT et le taux de GSH. Ceux-ci suggèrent que l'E.Br peut avoir une activité antioxydante *in vivo* et hépatoprotectrice contre l'hépatotoxicité induite par CCl₄.

La présente étude est le premier rapport sur le profil phytochimique, de toxicité, l'activité antioxydante (*in vitro* et *in vivo*) et l'activité hépatoprotectrice de *T. pallidus*. Les résultats de

cette étude indiquent clairement les bénéfices potentiels de la plante pour la santé dans les préparations alimentaires et pharmaceutiques. Par conséquent, davantage de recherches et d'études sont nécessaires car il existe un grand réservoir inexploité qui attend d'être étudié.

Les recherches futures devraient inclure des recherches supplémentaires visant à ;

- ✓ Identifier, isoler et caractériser davantage de constituants actifs responsables de la forte activité antioxydante observée afin de déterminer le mécanisme exact de l'activité antioxydante.
- ✓ Evaluation de l'effet antioxydant *in vitro* des extraits en utilisant d'autres techniques
- ✓ Evaluation d'autres activités pharmacologiques comme l'activité antidiabétique et l'activité anti-inflammatoire
- ✓ Des études similaires *in vivo* seraient intéressantes
- ✓ Isolement, caractérisation et l'étude des activités biologiques des composés actifs d'extraits.

Les références bibliographies

- Abdu S.B. & Al-Bogami F.M. (2019). Influence of resveratrol on liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in male rats. *Saudi J Biol Sci.*26(1): 201-209.
- Abotaleb M., Samuel S., Varghese E., Varghese S., Kubatka P., Liskova A. & Büsselberg D. (2019). Flavonoids in cancer and apoptosis. *Cancers.* 11(1): 13-28.
- Abramovič, H., Grobin, B., Ulrih, N. P., & Cigić, B. (2017). The methodology applied in DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu assays has a large influence on the determined antioxidant potential. *Acta Chim Slov.* 64(2): 491-499.
- Abu F., Taib M., Norma C., Moklas M., Aris M. & Mohd Akhir S. (2017). Antioxidant properties of crude extract, partition extract, and fermented medium of *Dendrobium sabin* flower. *Evid Based Complement Alternat Med.*2017: 2907219.
- Abu-Gharbieh E., Shehab N.G., Almasri I.M. & Bustanji Y. (2018). Antihyperuricemic and xanthine oxidase inhibitory activities of *Tribulus arabicus* and its isolated compound, ursolic acid: *In vitro* and *in vivo* investigation and docking simulations. *PLoS one.* 13(8): 119-128.
- Ademiluyi A.O., Aladeselu O.H., Oboh G. & Boligon A.A. (2018). Drying alters the phenolic constituents, antioxidant properties, α -amylase, and α -glucosidase inhibitory properties of *Moringa oleifera* leaf. *Food Sci Nutr.* 6(8): 2123-2133.
- Adjimani J.P. & Asare P. (2015). Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicol Rep.* 2: 721-728.
- Afsar T., Razak S., Khan M.R., Mawash S., Almajwal A., Shabir M. & Haq I.U. (2016). Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydasypica* R. parker aerial parts. *BMC Complement Altern Med.* 16(1): 258-267.
- Ajaghaku D.L., Obasi O., Umeokoli B.O., Ogbuatu P., Nworu C.S., Ilodigwe E.E. & Okoye F.B.C. (2017). *In vitro* and *in vivo* antioxidant potentials of *Alchornea floribunda* leaf extract, fractions and isolated bioactive compounds. *Avicenna J Phytomed.* 7(1): 80-92.
- Akar Z., Küçük M. Doğan H. (2017). A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 32:640-647.
- Akinwumi B., Bordun K.A. & Anderson H. (2018). Biological activities of stilbenoids. *Int J Mol Sci.* 19(3): 792-803.
- Alagawany M., El-Hack M.E.A., Farag M.R., Gopi M., Karthik K., Malik Y.S. & Dhama K. (2017). Rosmarinic acid: Modes of action, medicinal values and health benefits. *Anim Health Res Rev.* 18(2): 167-176.
- Al-Gubory K.H. (2014). Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. *Reprod Biomed Online.* 29(1): 17-31.
- Al-Sagheer A.A., Daader A.H., Gabr H.A. & Abd El-Moniem E.A. (2017). Palliative effects of extra virgin olive oil, gallic acid, and lemongrass oil dietary supplementation on growth performance, digestibility, carcass traits, and antioxidant status of heat-stressed growing New Zealand white rabbits. *Environ Sci Pollut Res Int.* 24: 6807-6818.

- Al-Seeni M.N., El Rabey H.A., Zamzami M.A. & Alnefayee A.M. (2016). The hepatoprotective activity of olive oil and *Nigella sativa* oil against CCl₄ induced hepatotoxicity in male rats. *BMC Complement Altern Med.* **16**: 438-447.
- Altemimi A., Lakhssassi N., Baharlouei A., Watson D. & Lightfoot D. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants.* **6(4)**: 42-53.
- Álvarez-Martínez F.J., Barrajón-Catalán E., Encinar J.A., Rodríguez-Díaz J.C. & Micol V. (2019). Antimicrobial capacity of plant polyphenols against gram-positive bacteria: A comprehensive review. *Curr Med Chem.* **25**: 1-13.
- Aminjafari A., Miroliaei M., Angelova V.T., Emamzadeh R., Djukic M.M., Djuric A. & Saso L. (2016). Antioxidant activity and protective role on protein glycation of synthetic aminocoumarins. *Electron J Biotechnol.* **19(6)**: 43-48.
- Amorati R. & Valgimigli L. (2018). Methods to measure the antioxidant activity of phytochemicals and plant extracts. *J Agric Food Chem.* **66(13)**: 3324-3329.
- Anosike C.A., Igboegwu O.N. & Nwodo O.F.C. (2018). Antioxidant properties and membrane stabilization effects of methanol extract of *Mucuna pruriens* leaves on normal and sickle erythrocytes. *J Tradit Complement Med.* **12**: 548-556.
- Apak R., Özyürek M., Güçlü K. & Çapanoğlu E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J Agric Food Chem.* **64(5)**: 997-1027.
- Araya E.M., Adamu B.A., Periasamy G., Sintayehu B. & Hiben M.G. (2019). *In vivo* hepatoprotective and *in vitro* radical scavenging activities of *Cucumis ficifolius* A. rich root extract. *J Ethnopharmacol.* **242**:112-131.
- Asdadi A., Alilou K, Akssira M, IdrissiHassani L-M, Chebli B, Moutaj R, González-Mas C. & Amparo M. (2014). Chemical composition and anticandidal effect of three *thymus* species essential oils from southwest of Morocco against the emerging nosocomial fluconazole-resistant strains. *J Bio Agr Healthcar.* **4(11)**: 16-26.
- Ashor A.W., Siervo M. & Mathers J.C. (2016). Vitamin C, antioxidant status, and cardiovascular aging. In *molecular basis of nutrition and aging* (pp. 609-619). Academic Press.
- Assi M.A., Hezme M.N.M., Haron A.W., Sabri M.Y.M. & Rajion M.A. (2016). The detrimental effects of lead on human and animal health. *Vet World.* **9(6)**: 660-671.
- Awad M.A., Aldosari S.R. & Abid M.R. (2018). Genetic alterations in oxidant and anti-oxidant enzymes in the vascular system. *Front Cardiovasc Med.* **5**: 107-115.
- Baghiani A, Boussoualim N., Aouachria S., Arrar L. & Boumerfeg S. (2013). *In vivo* free radical scavenging, antihemolytic activity and antibacterial effects of *Anchusa azurea* extracts. *Int J Med Med Sci.* **46**:1113-1118
- Baghiani A., Boumerfeg S., Belkhiri F., Khennouf S., Charef N., Harzallah, D. & Mosaad Attia A.W. (2010). Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L extracts grow wild in Algeria flora. *Comun Sci.* **1(2)**: 128-136.

- Barbieri R., Coppo E., Marchese A., Daglia M., Sobarzo-Sanchez E., Nabavi, S.F. & Nabavi S.M. (2017). Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol Res.* **196**: 44-68.
- Barros L., Dueñas M., Dias M.I., Sousa M.J., Santos-Buelga C. & Ferreira I.C.F.R. (2013). Phenolic profiles of cultivated, *in vitro* cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chem.* **136**: 1-8.
- Battelli M.G., Bortolotti M., Polito L. & Bolognesi A. (2018). The role of xanthine oxidoreductase and uric acid in metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* **1864(8)**: 2557-2565.
- Belkhiri F., Baghiani A., Zerroug M.M. & Arrar L. (2017). Investigation of antihemolytic, xanthine oxidase inhibition, antioxidant and antimicrobial properties of *Salvia verbenaca* L. aerial part extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* **14**: 273-281.
- Benhar M. (2018). Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. *Free Radic Biol Med.* **127**: 160-164.
- Bhakuni G.S., Bedi O., Bariwal J., Deshmukh R. & Kumar P. (2016). Animal models of hepatotoxicity. *Inflamm Res.* **65**: 13-24.
- Bijalwan V., Ali U., Kesarwani A.K., Yadav K. & Mazumder K. (2016). Hydroxycinnamic acid bound arabinoxylans from millet brans-structural features and antioxidant activity. *Int J Biol Macromol.* **88**: 296-305.
- Bilancio G., Cavallo P., Ciacci C. & Cirillo M. (2019). Dietary protein, kidney function and mortality: review of the evidence from epidemiological studies. *Nutrients.* **11(1)**: 196-203.
- Bittner F.S., Kello M., Čoma M., Slobodníková L., Drobná E., Holková I. & Lukáč M. (2019). Derivatization of rosmarinic acid enhances its *in vitro* antitumor, antimicrobial and antiprotozoal properties. *Molecules.* **24(6)**: 1078.1085.
- Blade C., Aragonés G., Arola-Arnal A., Muguerza B., Bravo F.I., Salvado M.J., Arola L. & Suarez M. (2016). Proanthocyanidins in health and disease. *Biofactors.* **42**: 5-12.
- Blumberg J., Bailey R., Sesso H. & Ulrich C. (2018). The evolving role of multivitamin/multimineral supplement use among adults in the age of personalized nutrition. *Nutrients.* **10(2)**: 248-261.
- Bonamigo T., Campos J.F., Oliveira A.S., Torquato H.F.V., Balestieri J.B.P., Cardoso C.A.L. & dos Santos E.L. (2017). Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. *PloS one.* **12(9)**: 0183983.
- Bourhia M., Haj Said A.A., Chaanoun A., El Gueddari F., Naamane A., Benbacer L. & Khilil N. (2019). Phytochemical screening and toxicological Study of *Aristolochia baetica* L. Roots: Histopathological and biochemical evidence. *J Toxicol.* **2019**: 8203832.
- Bryk D., Olejarz W. & Zapolska-Downar D. (2017). The role of oxidative stress and NADPH oxidase in the pathogenesis of atherosclerosis. *Postepy Hig Med Dosw.* **71**: 57-68.
- Călinoiu L. & Vodnar D. (2018). Whole grains and phenolic acids: A review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability. *Nutrients.* **10(11)**: 1615-1624.

- Cao H., Ou J., Chen L., Zhang Y., Szkudelski T., Delmas D., *et al.* (2018). Dietary polyphenols and type 2 diabetes: human study and clinical trial. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **19**: 1-9.
- Cao W., Hu C., Wu L., Xu L. & Jiang W. (2016). Rosmarinic acid inhibits inflammation and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by suppression of NF- κ B signaling in H22 tumor-bearing mice. *J Pharmacol Sci.* **132**(2):131-137.
- Capanoglu E., Kamiloglu S., Ozkan G. & Apak R. (2018). Evaluation of antioxidant activity/capacity measurement methods for food products. In: *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd*, 273-286.
- Carocho M., Ferreira I. C., Morales P. & Soković M. (2018). Antioxidants and prooxidants: effects on health and aging. *Oxid Med Cell Longev.* **2018**: 1472708.
- Castro R.I., Forero-Doria O., Soto-Cerda L., Peña-Neira A. & Guzmán L. (2018). Protective effect of pitao (*Pitavia punctata* (R. & P.) Molina) polyphenols against the red blood cells lipoperoxidation and the *in vitro* LDL oxidation. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2018**: 1049234.
- Chedea V.S. & Pop R.M. (2019). Total polyphenols content and antioxidant DPPH assays on biological samples. In *Polyphenols in Plants* (pp. 169-183). Academic Press.
- Chen H., Zhang Q., Wang X., Yang J. & Wang Q. (2011). Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MSⁿ. *Phytochem Anal.* **22**: 247-257.
- Chen L., Cao H. & Xiao J. (2018). Polyphenols: Absorption, bioavailability, and metabolomics. In *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 45-67). Woodhead Publishing.
- Chen T.Y., Kritchevsky J., Hargett K., Feller K., Klobusnik R., Song B.J., Cooper B., Jouni Z., Ferruzzi M.G. & Janle E M. (2015). Plasma bioavailability and regional brain distribution of polyphenols from apple/grape seed and bilberry extracts in a young swine model. *Mol Nutr Food Res.* **59**: 2432-2447.
- Chiu Y.J., Chou S.C., Chiu C.S., Kao C.P., Wu K.C., Chen C.J. & Peng W.H. (2018). Hepatoprotective effect of the ethanol extract of *Polygonum orientale* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *J Food Drug Anal.* **26**(1): 369-379.
- Clifford M.N., Johnston K.L., Knight S. & Kuhnert N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *J Agric Food Chem.* **51**:2900-2911.
- Colomer R., Sarrats A., Lupu R. & Puig T. (2017). Natural polyphenols and their synthetic analogs as emerging anticancer agents. *Curr Drug Targets.* **18**: 147-159.
- Colucci R., Dragoni F. & Moretti S. (2015). Oxidative stress and immune system in vitiligo and thyroid diseases. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2015**: 631927.
- Contreras Z.M.L. & Hernández M.R. (2016). Is liver enzyme release really associated with cell necrosis induced by oxidant stress?. *Oxid Med Cell Longev.* **2016**: 3529149.
- Cory H., Passarelli S., Szeto J., Tamez M. & Mattei J. (2018). The role of polyphenols in human health and food systems: a mini-review. *Front Nutr.* 2018 (**5**): 87-97.

- Cvejić J.H., Krstonosic' M.A, Bursac' M. and Miljic'U. (2017). Polyphenols. In: Galanakis C.M. Nutraceutical and functional food components: effects of innovative processing techniques. First edition, Elsevier: Amsterdam. 203-238.
- D'Abrosca B., Lavorgna M., Scognamiglio M., Russo C., Graziani V., Piscitelli C., Fiorentino, A. & Isidori M. (2017). 2D-NMR investigation and *in vitro* evaluation of antioxidant, antigenotoxic and estrogenic/antiestrogenic activities of strawberry grape. *Food Chem.Toxicol.* **105**: 52-60.
- da Cunha L.R., Muniz-Junqueira M.I. & dos Santos Borges T.K. (2019). Impact of polyphenols in phagocyte functions. *Journal of inflammation research*, 12, 205. 55-62.
- Damašius J., Venskutonis P.R., Kaškonienė V. & Maruška A. (2014). Fast screening of the main phenolic acids with antioxidant properties in common spices using on-line HPLC/UV/DPPH radical scavenging assay. *Anal Methods.* 6(8): 2774-2779.
- De Filippis B., Ammazalorso A., Amoroso R. & Giampietro L. (2019). Stilbene derivatives as new perspective in antifungal medicinal chemistry. *Drug Develop Res.* 80(3): 285-293.
- Delfanian M., Kenari R.E. & Sahari M.A. (2016). Evaluation of antioxidant activity of loquat fruit (*Eriobotrya japonicalindl.*) skin and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil. *J Food Sci Technol.* 53(5): 2244-2252.
- Della P.F. & Compagnone, D. (2018). Nanomaterial-based sensing and biosensing of phenolic compounds and related antioxidant capacity in food. *Sensors.* 18(2): 462-475.
- Den Hartogh D.J. & Tsiani E. (2019). Antidiabetic properties of naringenin: a citrus fruit polyphenol. *Biomolecules.* 9(3): 99-108.
- Di Meo S., Reed T.T., Venditti P. & Victor V.M. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev.* **2016**: 1245049.
- Dias J.S. (2019). Nutritional Quality and Effect on Disease Prevention of Vegetables. In *Nutrition in Health and Disease*. IntechOpen.
- Domínguez Avila J., Rodrigo Garcia J., González Aguilar G. & de la Rosa L. (2017). The antidiabetic mechanisms of polyphenols related to increased glucagon-like peptide-1 (GLP1) and insulin signaling. *Molecules.* 22(6): 903-914.
- Dong Y., Huang H., Zhao M., Sun-Waterhouse D., Lin L. & Xiao C. (2016). Mechanisms underlying the xanthine oxidase inhibitory effects of dietary flavonoids galangin and pinobanksin. *J Funct Food.* **24**: 26-36.
- Dutta S., Chakraborty A.K., Dey P., Kar P., Guha P., Sen S., Sen A., & Chaudhuri T.K. (2018). Amelioration of CCl₄ induced liver injury in swiss albino mice by antioxidant rich leaf extract of *Croton bonplandianus* Baill. *PloS one.* 13(4):0196411.
- Edge R. & Truscott T. (2018). Singlet oxygen and free radical reactions of retinoids and carotenoids-A review. *Antioxidants.* 7(1): 5-13.
- Eggersdorfer M. & Wyss A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Arch Biochem Biophys.* **652**: 18-26.

- El-Demerdash F.M., Tousson E.M., Kurzepa J. & Habib S.L. (2018). Xenobiotics, oxidative stress, and antioxidants. *Oxid Med Cell Longev.* **2018**: 9758951.
- Elufioye T.O. & Habtemariam S. (2019). Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. *Biomed. Pharmacother.* **112**: 108600.
- Emilie A., François C., Geneviève B., Mayoura B., Jérémy J., Jaime L. *et al.* (2019). Herbal medicine for epilepsy seizures in Asia, Africa and Latin America: A systematic review. *J Ethnopharmacol.* **234**:119-153.
- Erhirhie E.O., Ihekwereme C.P. & Ilodigwe E.E. (2018). Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdiscip Toxicol.* **11(1)**: 5-12.
- Escudero-Lopez B., Calani L., Fernandez-Pachon M.S., Ortega A., Brighenti F., Crozier A. & Del R.D. (2014). Absorption, metabolism, and excretion of fermented orange juice (poly)phenols in rats. *Biofactors***40**: 327-335.
- Escobar-Cévoli R., Castro-Espín C., Béraud V., Buckland G., Zamora-Ros R., & Béraud G.B.V. (2017). An Overview of Global Flavonoid Intake and its Food Sources *In: Flavonoids-From Biosynthesis to Human Health.* 152-169.
- Espíndola K.M., Ferreira R.G., Narvaez L.E., Silva R.A., da Silva A.M., Silva A.B. & Monteiro M.C (2019). Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. *Front Oncol.***9**: 541-552.
- Ewald C.Y., Hourihan J.M., Bland M.S., Obieglo C., Katic I., Moronetti M.L.E., Alcedo J., Blackwell T.K. & Hynes N.E. (2017). NADPH oxidase-mediated redox signaling promotes oxidative stress resistance and longevity through memo-1 in *C. elegans*. *Elife.* **6**:11-22.
- Farhadi F., Khameneh B., Iranshahi M. & Iranshahi M. (2019). Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytother Res.* **33(1)**: 13-40.
- Fernandes I., Pérez-Gregorio R., Soares S., Mateus N. & de Freitas V. (2017). Wine flavonoids in health and disease prevention. *Molecules.* **22(2)**: 292-304.
- Feyisayo A.F. Oluwafemi A.V. & Oluokun O.O. (2015). Evaluation of antioxidant capacity and membrane stabilizing potential of stem and root of *Cyphospenna adenocaulis* (Steud). *Afr J Biotechnol.* **14(21)**:1820-1827.
- Figueira I., Garcia G., Pimpão R.C., Terrasso A.P., Costa I., Almeida A.F. & Filipe A. (2017). Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection. *Sci Rep.* **7(1)**: 11456.
- Fortney L, Podein R & Hernke M. Detoxification. In: Rakel D, ed. Integrative Medicine. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; **2017**: 996-1003.
- Foti M.C. (2015). Use and abuse of the DPPH• radical. *J Agric Food Chem.* **63(40)**: 8765-8776.
- Fraga C.G., Croft K.D., Kennedy D.O. & Tomás-Barberán F.A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* **10(2)**: 514-528.
- Fu G., Tong H., Zeng H., Zou B., Chai J., Zhang L. & Wan, Y. (2018). Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of *Eucommia ulmoides* Oliver leaf extracts. *Pak J Pharm Sci.* **31(4)**: 1333-1339.

- Galiniak S., Aebisher D. & Bartusik-Aebisher D. (2019). Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochim Pol.* 66(1): 13-21.
- Ganguli G., Mukherjee U. & Sonawane A. (2019). Peroxisomes and Oxidative stress: their implications in the modulation of cellular immunity during mycobacterial infection. *Front Microbiol.* 14(10): 1121-1131.
- Gaschler M.M. & Stockwell B.R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 482(3): 419-425.
- Gaucher C., Boudier A., Bonetti J., Clarot I., Leroy P. & Parent M. (2018). Glutathione: Antioxidant properties dedicated to nanotechnologies. *Antioxidants.* 7(5): 62-75.
- Gautam R.K., Gupta G., Sharma S., Hatware K., Patil K., Sharma K. & Dua K. (2019). Rosmarinic acid attenuates inflammation in experimentally induced arthritis in Wistar rats, using Freund's complete adjuvant. *Int J Rheum Dis.* 22(7): 1247-1254.
- Gavric J., Anđelković M., Tomović L., Prokić M., Despotović S., Radovanović T., Pavlović S. & Sačić Z. (2017). Oxidative stress biomarkers, cholinesterase activity and biotransformation enzymes in the liver of dice snake (*Natrix tessellata* Laurenti) during pre-hibernation and post-hibernation. *Ecotoxicol Environ Saf.* 138: 154-162.
- Ginwala R., Bhavsar R., Chigbu D.G.I., Jain P. & Khan Z. K. (2019). Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. *Antioxidants*, 8(2), 35-43.
- Glennon-Alty L., Hackett A.P., Chapman E.A. & Wright H.L. (2018). Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease. *Free Radic Biol Med.* 125: 25-35.
- Gómez G.M., Rodríguez-Nogales A., Algieri F. & Gálvez J. (2018). Potential role of seaweed polyphenols in cardiovascular-associated disorders. *Mar drugs.* 16(8): 250-259.
- González P.A.M., Ayuda D.B., Martínez S., González M.S. & Santos B.C. (2018). The mechanisms behind the biological activity of flavonoids. *Curr Med Chem.* 35: 1-15.
- Goodla L., Manubolu M., Pathakoti K., Jayakumar T., Sheu J.R., Fraker M. & Poondamalli P.R. (2019). Protective effects of *Ammannia baccifera* against CCl₄-induced oxidative stress in rats. *Int J Environ Res Public Health.* 16(8): 1440-1452.
- Gourlay G. & Constabel C.P. (2019). Condensed tannins are inducible antioxidants and protect hybrid poplar against oxidative stress. *Tree Physiol.* 39(3): 345-355.
- Gupta P.K. (2018). *Illustrated Toxicology: With Study Questions*. Academic Press.
- Hahn H.J., Kim K.B., An I.S., Ahn K.J. & Han H.J. (2017). Protective effects of rosmarinic acid against hydrogen peroxide-induced cellular senescence and the inflammatory response in normal human dermal fibroblasts. *Mol Med Rep.* 16(6): 9763-9769.
- Haida Z. & Hakimian M. (2019). A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Sci Nutr.* 7(5): 1555-1563.

- Hammoudi R., Dehak K., Tlili M.L., Khenfer S., Medjouel M. and Hadj Mahammed M. (2017). Biological activities of phenolic extracts of a medicinal plant, endemic to the Algerian Sahara: *Salvia chudaei* Batt. and Trab. *Int J Biosci.* **11**: 108-115.
- Hanakova Z., Hošek J., Kutil Z., Temml V., Landa P., Vanek T. & Smejkal K. (2017). Anti-inflammatory activity of natural geranylated flavonoids: Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitory properties and proteomic analysis. *J Nat Prod.* 80(4): 999-1006.
- Hasan K.M.M., Tamanna N. & Haque M.A. (2018). Biochemical and histopathological profiling of Wistar rat treated with *Brassica napus* as a supplementary feed. *Food Sci Hum Well.* 7(1): 77-82.
- Hasanein P. & Sharifi, M. (2017). Effects of rosmarinic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male Wistar rats. *Pharm Biol.* 55(1): 1809-1816.
- Hellerbrand C., Schattenberg J.M., Peterburs P., Lechner A. & Brignoli R. (2017). The potential of silymarin for the treatment of hepatic disorders. *Clin Phytosci.* 2(1): 1-14.
- Hematyar N., Rustad T., Sampels S. & Kastrup D.T. (2019). Relationship between lipid and protein oxidation in fish. *Aquac. Res.* 50(5): 1393-1403.
- Herzog K., IJlst L., van Cruchten A.G., van Roermund C.W., Kulik W., Wanders R.J. & Waterham H. R. (2019). An UPLC-MS/MS assay to measure glutathione as marker for oxidative stress in cultured cells. *Metabolites.* 9(3): 45-55.
- Holstege A. (2016). Elevated liver enzymes. *Dtsch Med Wochenschr.* **141** : 1640-1646.
- Homma T. & Fujii J. (2019). Oxidative stress and dysfunction of the intracellular proteolytic machinery: a pathological hallmark of nonalcoholic fatty liver disease. In *Dietary Interventions in Liver Disease* (pp. 59-70). Academic Press.
- Hu R., He Y., Arowolo M.A., Wu S. & He J. (2019). Polyphenols as potential attenuators of heat stress in poultry production. *Antioxidants.* 8(3): 67-78.
- Huang D. 2018. Dietary antioxidants and health promotion *Antioxidants.* 2018: 7(1): 1-9.
- Huang M., Wang P., Xu S., Xu W., Xu W., Chu K. & Lu J. (2015). Biological activities of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* on type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Pharm Biol.* 53(7): 1058-1065.
- Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou M.C. & Rahu N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2016**.15-25.
- Huyut Z., Beydemir Ş., & Gülçin İ. (2017). Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochem Res Intern.* **2017**: 35-45.
- Ighodaro O.M. & Akinloye O.A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Med J.* 54(4): 287-293.
- Incalza M.A., D'Oria R., Natalicchio A., Perrini S., Laviola L. & Giorgino F. (2017). Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol.* **100**:1-19.

- Ironi E.A., Adegoke B.M., Effion E.S., Oyewo S.O., Alamu E.O. & Boligon A.A. (2019). Enzymes inhibitory property, antioxidant activity and phenolics profile of raw and roasted red sorghum grains *in vitro*. *Food Sci Hum Well*. 8(2): 142-148.
- Ito F., Sono Y. & Ito T. (2019). Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: Oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants*. 8(3): 72-83.
- Jaramillo F.M.E. (2019). Cocoa flavanols: Natural agents with attenuating effects on metabolic syndrome risk factors. *Nutrients*. 11(4) : 751-761.
- Jayanthi G., & Subramanian S. (2014). Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet–STZ induced experimental diabetes mellitus. *Biomed Prev Nut*. 4(3) : 431-437.
- Jiménez-Arellanes M.A., Gutiérrez-Rebolledo G.A., Meckes F.M. & León-Díaz R. (2016). Medical plant extracts and natural compounds with a hepatoprotective effect against damage caused by antitubercular drugs: a review. *Asian Pac J Trop Med*. 9(12): 1141-1149.
- Jucá M.M., Cysne Filho F.M.S., de Almeida J.C., Mesquita D.D.S., Barriga J.R.D.M., Dias K.C.F. & Vasconcelos S.M.M. (2018). Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Nat Prod Res*. 16: 1-14.
- Kasote D.M., Jayaprakasha G.K., Patil B.S. (2019). Leaf disc assays for rapid measurement of antioxidant activity. *Sci Rep*. 9(1): 1884-1893.
- Kasprzak M.M., Erxleben, A. & Ochocki J. (2015). Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Adv*. 5(57): 45853-45877.
- Katerji M., Filippova M. & Duerksen-Hughes P. (2019). Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: research applications in the cancer field *Oxid Med Cell Longev*. 2019: 1279250.
- Khamse S., Sadr S.S., Roghani M., Hasanzadeh G. & Mohammadian M. (2015). Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. *Pharm Biol*. 53(12): 1818-1825.
- Khan N. & Mukhtar H. (2018). Tea polyphenols in promotion of human health. *Nutrients*. 11(1):39-47.
- Khayat S., Al-Zahrani S.H., Basudan N., Al-Zahrani N.H. & Subahi, J.A. (2018). Chemical composition and *in vitro* antibacterial activities of traditional medicinal plant: *Olea sp*. *Biom Res*. 29: 1037-1047.
- Khoubnasabjafari M., Ansarin K. & Jouyban A. (2016). Critical review of malondialdehyde analysis in biological samples. *Curr Pharm Anal*. 12(1): 4-17.
- Klaunig J.E. & Wang Z. (2018). Oxidative stress in carcinogenesis. *Curr Opin Toxicol*. 7: 116-121.
- Krupkova O., Handa J., Hlavna M., Klasen J., Ospelt C., Ferguson S.J. & Wuertz-Kozak K. (2016). The natural polyphenol epigallocatechin gallate protects intervertebral disc cells from oxidative stress. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2016: 7031397.

- Küçük S., Soyer P. & Tunalı Y. (2019). Determination of antimicrobial and biological activities of *Salvia sclarea* L. (Lamiaceae) extracts. *J Turkish Chem Soc A*. 6 (1): 15-20.
- Kumari S., Deori M., Elancheran R., Kotoky J. & Devi R. (2016). *In vitro* and *in vivo* antioxidant, anti-hyperlipidemic properties and chemical characterization of *Centella asiatica* (L.) extract. *Front Pharmacol*. 7: 400-412.
- Kupina S., Fields C., Roman M.C. & Brunelle S.L. (2018). Determination of total phenolic content using the Folin-c assay: single-laboratory validation, first action 2017.13. *AOAC Int*. 101(5):1466-1472.
- Lama A., Pirozzi C., Mollica M.P., Trinchese G., Di G.F., Cavaliere G., Calignano A., Mattace R.G., Berni C.R. & Meli R. (2017). Polyphenol-rich virgin olive oil reduces insulin resistance and liver inflammation and improves mitochondrial dysfunction in high-fat diet fed rats. *Mol Nutr Food Res*. 61:65-77.
- Lee M.T., Lin W.C., Yu B. & Lee T.T. (2017). Antioxidant capacity of phytochemicals and their potential effects on oxidative status in animals-A review. *Asian-Australas J Anim Sci*. 30(3): 299-308.
- Lemos V.C., Reimer J.J. & Wormit A. (2019). Color for Life: Biosynthesis and Distribution of Phenolic Compounds in Pepper (*Capsicum annuum*). *Agriculture*. 9(4): 1-30.
- Li H.B., Wong C.C., Cheng K.W. & Chen F. (2008). Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Sci Technol*. 41(3): 385-390.
- Li L., Zhou Y.F., Li Y.L., Wang L.L., Arai H. & Xu Y. (2017). *In vitro* and *in vivo* antioxidative and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Cortex dictamni*. *World J Gastroenterol*. 23(16): 2912.
- Li X., Chen B., Xie H., He Y., Zhong D. & Chen D. (2018). Antioxidant structure–activity relationship analysis of five dihydrochalcones. *Molecules*. 23(5): 1162-1171.
- Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L. Della M. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 13: 757-772.
- Lin D., Xiao M., Zhao J., Li Z., Xing B., Li X. & Chen H. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*. 21(10): 1374.
- Lin S., Zhang G., Liao Y., Pan J. & Gong D. (2015). Dietary flavonoids as xanthine oxidase inhibitors: structure–affinity and structure–activity relationships. *J Agric Food Chem*. 63(35): 7784-7794.
- Lins P.G., Pugine S.M.P., Scatolini A.M. & de Melo M.P. (2018). *In vitro* antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. *Heliyon*. 4(9): 312-321.
- Liu A.H., Guo H., Ye M., Lin Y.H., Sun J.H., Xu M. & Guo D.A. (2007). Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1161: 170-182.
- Liu Z., Ren Z., Zhang J., Chuang C.C., Kandaswamy E., Zhou T. & Zuo L. (2018). Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Front Physiol*. 9: 477-480.

- Lonardo A. & Romagnoli D. (2016). Gamma glutamyl transferase: A novel cardiovascular outfit for an old liver test. *Indian J Med Res.* **143**: 4-7.
- Louvet A. & Mathurin P. (2015). Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **12**: 231-242.
- Lowe J.S., Anderson P.G. & Anderson S.I. (2018). *Stevens & Lowe's Human Histology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Lozano S.S.A., Rincón-Sánchez A.R. & Rivas-Estíll A.M. (2019). Antioxidants benefits in hepatitis C infection in the new DAAs era. *Ann Hepatol.* **18(3)**:410-415.
- Luciano G., Roscini V., Mattioli S., Ruggeri S., Gravador R.S., Natalello A., Lanza M., De A. A. & Priolo A. (2017). Vitamin E is the major contributor to the antioxidant capacity in lambs fed whole dried citrus pulp. *Animal.* **11**: 411-417.
- Ly C., Yockell L.J., Ferraro Z.M., Arnason J.T., Ferrier J. & Gruslin A. (2014). The effects of dietary polyphenols on reproductive health and early development. *Hum Reprod Update.* **21(2)**: 228-248.
- Ma L., Tang L. & Yi Q. (2019). Salvianolic acids: potential source of natural drugs for the treatment of fibrosis disease and cancer. *Front Pharmacol.* **10**: 97-105.
- Maazoun A.M., Belhadj F., Jemâa J.B. & Marzouki M.N. (2018). Assessment of antioxidant potential and α -amylase and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Urginea maritima* (L.) Baker bulbs. *J Mater Environ Sci.* **9(12)**: 3197-3205.
- Magnani F. & Mattevi A. (2019). Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Curr Opin Struct Biol.* **59**: 91-97.
- Mahmoud A.M., Hernández Bautista R.J., Sandhu M.A. & Hussein O.E. (2019). Beneficial effects of citrus flavonoids on cardiovascular and metabolic health. *Oxid Med Cell Longev.* **2019**: 5484138.
- Makris K. & Spanou L. (2016). Acute kidney injury: diagnostic approaches and controversies. *Clin Biochem Rev.* **37(4)**: 153.
- Marín L., Miguélez E.M., Villar C.J. & Lombó F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int.* **2015**: 905215
- Markham K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification (Chapter 1 and 2). First edition, Academic Press : London. p.1-113.
- Marmouzi I., Karym E., Saidi N., Meddah B., Kharbach M., Masrar A. & Faouzi M. (2017). *In vitro* and *in vivo* antioxidant and anti-hyperglycemic activities of Moroccan Oat cultivars. *Antioxidants.* **6(4)**: 102-111.
- Mathew B., Suresh J. Mathew G., Rasheed S., Vilapurathu J. & Jayaraj P. (2015). Flavonoids: An outstanding structural core for the inhibition of xanthine oxidase enzyme. *Curr Enzy Inhibi.* **11(2)**: 108-115.
- Mathew S., Abraham T.E. & Zakaria Z.A. (2015). Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under *in vitro* conditions. *J Food Sci Technol.* **52(9)**: 5790-5798.
- Matschke V., Theiss C., Matschke J. (2019). Oxidative stress: the lowest common denominator of multiple diseases. *Neural Regen Res.* **14 (2)**: 238-241.

- Mazzetti A.P., Fiorile M.C., Primavera A. & Lo, B.M. (2015). Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int.* **82**: 10-18.
- McGill M.R. & Jaeschke H. Animal models of drug-induced liver injury. (2019). *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1865(5):1031-1039.
- McKee R.H., Adenuga M.D. & Carrillo J.C. (2015). Characterization of the toxicological hazards of hydrocarbon solvents. *Crit Rev Toxicol.* 45(4): 273-365.
- Md Sani S.S., Han W.H., Bujang M.A., Ding H.J., Ng K.L. & Amir Shariffuddin M. A. (2017). Evaluation of creatine kinase and liver enzymes in identification of severe dengue. *BMC. Infect Dis.* **17**: 505-514.
- Mehendale M., 7.19 - Halogenated Hydrocarbons, In: Comprehensive Toxicology (Second Edition), Elsevier, 2010, Pages 459-474, (Metabolisme de CCl₄)
- Memon N., Weinberger B.I., Hegyi T. & Aleksunes L.M. (2016). Inherited disorders of bilirubin clearance. *Pediatr Res.* **79**: 378-386.
- Minatel I.O., Borges C.V., Ferreira M.I., Gomez H.A.G., Chen C.Y.O. & Lima G.P.P. (2017). Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. In *Phenolic Compounds-Biological Activity*. InTech
- Misharina T.A. & Kiseleva V.I. (2019). Inhibition of autoxidation of paprika carotenoids by plant antioxidants. *Appl. Biochem. Microbiol.* 55(2): 182-188.
- Moldovan Z., Buleandră M., Oprea E. & Mînea Z. (2017). Studies on chemical composition and antioxidant activity of *Rudbeckia triloba*. *J Anal Methods Chem.* **2017**: 3407312.
- Mossa A.H., Heikal T.M., Mohafrash S.M. & Refaie A.A. (2015). Antioxidant potential and hepatoprotective activity of *Origanum majorana* leaves extract against oxidative damage and hepatotoxicity induced by pirimiphos-methyl in male mice. *J Appl Sci.* 15(1) : 69-79.
- Msaada K., Tammar S., Salem N., Bachrouch O., Sriti J., Hammami M. & Limam F. (2016). Chemical composition and antioxidant activities of tunisian *Thymus capitatus* L. methanolic extract. *Int J Food Prop.* 19(6): 1381-1390.
- Munoz M., Sanchez A., Pilar M.M., Benedito S., Lopez-Oliva M.E., Garcia-Sacristan A., Hernandez M. & Prieto D. (2015). COX-2 is involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction of renal interlobar arteries from obese Zucker rats. *Free Radic Biol Med.* **84**: 77-90.
- Muriel, P., Ramos-Tovar, E., Montes-Páez, G., & Buendía-Montaño, L. D. (2017). Experimental models of liver damage mediated by oxidative stress. In *Liver Pathophysiology* (pp. 529-546). Academic Press.
- Nakamura M., Ra J.H., Jee Y. & Kim J.S. (2017). Impact of different partitioned solvents on chemical composition and bioavailability of *Sasa quepaertensis* Nakai leaf extract. *J Food Drug Anal.* 25(2): 316-326.
- Naz R., Ayub H., Nawaz S., Islam Z.U., Yasmin T., Bano A. & Roberts T.H. (2017). Antimicrobial activity, toxicity and anti-inflammatory potential of methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. *BMC Complement Altern Med.* 17(1): 302-315.

- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem.* 178: 687-704.
- Nemmar A., Yuvaraju P., Beegam S., Yasin J., Kazzam E.E. & Ali B.H. (2016). Oxidative stress, inflammation, and DNA damage in multiple organs of mice acutely exposed to amorphous silica nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* **11**: 919-928.
- Ngo Y.L. & Chua L.S. (2018). Anti-diabetic activity of rosmarinic acid rich fractions from *Orthosiphon stamineus*. *Curr Enzy Inhib.* 14(2): 97-103.
- Nichols H.B., Anderson C., White A.J. Milne G.L. & Sandler D.P. (2017). Oxidative stress and breast cancer risk in premenopausal women. *Epidemiology.* 28(5):667-674.
- Nicolussi A., D'inzeo S., Capalbo C., Giannini G. & Coppa A. (2017). The role of peroxiredoxins in cancer. *Mol Clin Oncol.* 6(2): 139-153.
- Niki E. (2018). Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress?. *Free Radic Biol Med.* **124**: 564.
- Nimse S.B. & Pal D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Adv.* 5(35): 27986-28006.
- Nur Arina A.J. & Azrina A. (2016). Comparison of phenolic content and antioxidant activity of fresh and fried local fruits. *Int Food Res J.* **23**:1717-1724.
- Obert J., Cave M. & Marsano L. (2015). Liver diseases. *World Rev Nutr Diet.* **111**: 146-150.
- Oguntibeju O.O. (2019). Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 11(3): 45-63.
- Ojha R., Singh J., Ojha A., Singh H., Sharma S. & Nepali K. (2017). An updated patent review: xanthine oxidase inhibitors for the treatment of hyperuricemia and gout (2011-2015). *Expert Opin Ther Pat.* 27(3): 311-345.
- Okaiyeto K., Nwodo U.U., Mabinya L.V. & Okoh A.I. (2018). A review on some medicinal plants with hepatoprotective effects. *Pharmacogn Rev.* 12(24): 186-199.
- Olayode O.A., Daniyan M. & Olayiwola G. (2019). Biochemical, hematological and histopathological evaluation of the toxicity potential of the leaf extract of *Stachytarpheta cayennensis* in rats. *J Tradit Complement Med. In press.*
- Oliveira G.K.F., Tormin T.F., Sousa R.F, de Oliveira A., Richter E.M. & Munoz R.A.A. (2016). Batch injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. *Food Chem.* **192**: 691-697.
- Olivero-David R., Ruiz-Roso M.B., Caporaso N., Perez-Olleros L., De las Heras N., Lahera V., & Ruiz-Roso B. (2018). *In vivo* bioavailability of polyphenols from grape by-product extracts, and effect on lipemia of normocholesterolemic Wistar rats. *J Sci Food Agric.* 98(15):5581-5590.
- Olszowy M. & Dawidowicz A.L. (2018). Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds?. *Chem Pap.* 72(2): 393-400.
- Othman A., Mukhtar N.J., Ismail N.I. & Chang S.K. (2014). Phenolics, flavonoids content and antioxidant activities of 4 Malaysian herbal plants. *Int Food Res J.* **21**:759-766.

- Ouhaddou H., Boubaker H., Msanda F., El Mousadik A. (2014). An ethnobotanical study of medicinal plants of the agadir Ida outanane province (southwest Morocco). *J App Biosci.* **84**: 7707-7722.
- Pacula A.J., Kaczor K.B., Wojtowicz A., Antosiewicz J., Janecka A., Dlugosz A., Janecki T. & Scianowski J. (2017). New glutathione peroxidase mimetics-Insights into antioxidant and cytotoxic activity. *Bioorg Med Chem.* **25**: 126-131.
- Panche A.N., Diwan A.D. & Chandra S.R. (2016). Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* **5**: 47-61.
- Papuc C., Goran G.V., Predescu C.N., Nicorescu V. & Stefan G. (2017). Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: classification, structures, sources, and action mechanisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **16**(6): 1243-1268.
- Patterson J.C., Joughin B.A., van de Kooij B., Lim D.C., Lauffenburger D.A. & Yaffe M.B. (2019). ROS and oxidative stress are elevated in mitosis during asynchronous cell cycle progression and are exacerbated by mitotic arrest. *Cell Syst.* **8** (2):163-167.
- Peña-Bautista C., Baquero M., Vento M. & Chafer-Pericas C. (2019). Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clin Chim Acta.* **491**: 85-90.
- Pereira E., Barros L., Antonio A.L., Verde S.C., Santos-Buelga C. & Ferreira I.C.F.R. (2016). Infusions from *Thymus vulgaris* L. treated at different gamma radiation doses: Effects on antioxidant activity and phenolic composition. *LWT-Food Sci and Technol.* **74**: 34 -39.
- Pereira O.R., Peres A.M., Silva A.M.S., Domingues M.R.M. & Cardoso S.M. (2013). Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC-UV and ESI-MS combined method. *Food Res Int.* **54**: 1773-1780.
- Perera D., Soysa P. & Wijeratne S. (2016). Polyphenols contribute to the antioxidant and anti-proliferative activity of *Phyllanthus debilis* plant *in-vitro*. *BMC Complement Altern Med.* **16**(1): 339-348.
- Perez-Vizcaino F. & Fraga C.G. (2018). Research trends in flavonoids and health. *Arch Biochem Biophys.* **646**: 107-112.
- Pohanka M. (2017). Analytical tools for the determination of antioxidants and antioxidant capacity in biological samples, principles and applications. *Curr Organ Chem.* **21**: 2109-2116.
- Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C.J. & Valko M. (2017). Targeting Free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol Sci.* **38**(7): 592-607.
- Potì F., Santi D., Spaggiari G., Zimetti F. & Zanotti I. (2019). Polyphenol health effects on cardiovascular and neurodegenerative disorders: A review and meta-analysis. *Int J Mol Sci.* **20**(2): 351-362.
- Pradhan A., Bagchi A., De S., Mitra S., Mukherjee S., Ghosh P. & Chatterjee M. (2019). Role of redox imbalance and cytokines in mediating oxidative damage and disease progression of patients with rheumatoid arthritis. *Free Radic Res.* **53**(7):768-779.
- Qu J., Mei Q. & Niu R. (2019). Oxidative CaMKII as a potential target for inflammatory disease. *Mol Med Rep.* **20**(2): 863-870.

- Quan M., Li Q., Zhao P. & Tian C. (2018). Chemical composition and hepatoprotective effect of free phenolic extract from barley during malting process. *Sci Rep.* 8(1): 4460.
- Quezel P. & Santa S (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, Ed C.N.R.S. Paris. 804-806.
- Quy T.N. & Xuan T.D. (2019). Xanthine oxidase inhibitory potential, antioxidant and antibacterial activities of *Cordyceps militaris* (L.) link fruiting body. *Medicines.* 6(1): 20-28.
- Rady I., Mohamed H., Rady M., Siddiqui I.A. & Mukhtar H. (2018). Cancer preventive and therapeutic effects of EGCG, the major polyphenol in green tea. *Egypt J Basic Appl Sci.* 5(1): 1-23.
- Ramachandran A. & Jaeschke H. (2018). Oxidative stress and acute hepatic injury. *Curr Opin Toxicol.* 7: 17-21.
- Ramachandran A. & Jaeschke H. Drug-Induced Liver Injury, Volume 85, 2019, 288 Academic Press
- Raudone L., Vilckicyte G., Pitkauskaite L., Raudonis R., Vainoriene R. & Motiekaityte V. (2019). Antioxidant activities of *Vaccinium vitis-idaea* L. leaves within cultivars and their phenolic compounds. *Molecules.* 24(5): 844-853.
- Rauf A., Imran M., Abu-Izneid T., Patel S., Pan X., Naz S. & Suleria H.A.R. (2019). Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* 116: 108999.
- Reddy J.S., Rao G., Mallikajuna K. (2014). A review on hepatoprotective activity of some medicinal plants. *Int J Innov Pharm.* 5(2): 395-404.
- Reid A.M., Oosthuizen C.B., Fibrich B.D., Twilley D., Lambrechts I.A., de Canha M.N. & Lall N. (2018). Traditional Medicine: The ancient roots of modern practice. In *Medicinal Plants for Holistic Health and Well-Being* (pp. 1-11). Academic Press.
- Ren J., Fu L., Nile S.H., Zhang J. & Kai G. (2019). *Salvia miltiorrhiza* in treating cardiovascular diseases: A review on its pharmacological and clinical applications. *Front Pharmacol.* 10: 753-762.
- Roby M.H.H., Sarhan M.A., Selim K.A.H. & Khalel K.I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Indu Crops Prod.* 43: 827-831.
- Rosenfeld M.A., Vasilyeva A.D., Yurina L.V. & Bychkova A.V. (2018). Oxidation of proteins: is it a programmed process?. *Free Radic Res.* 52(1): 14-38.
- Rtibi K., Selmi S., Wannas D., Jridi M., Marzouki L. & Sebai H. (2019). The potential of *Thymus vulgaris* aqueous extract to protect against delayed gastric emptying and colonic constipation in rats. *Rsc Adv.* 9(36): 20593-20602.
- Ruskin R., Vasanthakumari B. & Citarasu T (2017). *In vitro* antioxidant activity of various leaf extracts of *Canthium coromandelicum* (Burm.f.) Alston. *Asian J Pharm Clin Res.* 10:214-218
- Sachana, M., & Hargreaves, A. J. (2018). Toxicological testing: *in vivo* and *in vitro* models. In *Veterinary Toxicology (Third Edition)* (pp. 145-161). Academic Press.
- Saha P., Talukdar A.D., Nath R., Sarkar, S., Nahar L., Sahu, J. & Choudhury M.D. (2019). Role of natural phenolics in hepatoprotection: A mechanistic review and analysis of regulatory network of associated genes. *Front Pharmacol.* 10: 509-521.

- Sales T.A., Prandi I.G., Castro A.A.D., Leal D.H., da Cunha E.F., Kuca K. & Ramalho T.C. (2019). Recent developments in metal-based drugs and chelating agents for neurodegenerative diseases treatments. *Int J Mol Sci.* 20(8): 1829.
- Santi M.D., Zunini M.P., Vera B., Bouzidi C., Dumontet V., Abin-Carriquiry A. & Ortega M. G. (2018). Xanthine oxidase inhibitory activity of natural and hemisynthetic flavonoids from *Gardenia oudiepe* (Rubiaceae) *in vitro* and molecular docking studies. *Eur J Med.Chem.* 143: 577-582.
- Santos J.S., Brizola V.R.A. & Granato D. (2017). High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. *Food Chem.* 214: 515-522.
- Santos S, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In *Antioxidants*. IntechOpen.
- Sarian M.N., Ahmed Q.U., So'ad M., Zaiton S., Alhassan A.M., Murugesu S. & Latip J. (2017). Antioxidant and antidiabetic effects of flavonoids: A structure-activity relationship based study. *Biomed Res Int.* 2017: 8386065.
- Satapathy S.K., Kuwajima V., Nadelson J., Atiq O., & Sanyal A.J. (2015). Drug-induced fatty liver disease: An overview of pathogenesis and management. *Ann Hepatol.* 14: 789-806.
- Schmeda-Hirschmann G., Quispe C., Soriano M.P., Theoduloz C., Jimenez-Aspee F., Perez M. J., Cuello A.S. & Isla M.I. (2015). Chilean prosopis mesocarp flour: phenolic profiling and antioxidant activity. *Molecules.* 20: 7017-7033.
- Scholten D., Trebicka J., Liedtke C. & Weiskirchen R. (2015). The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim.* 49: 4-11.
- Sepahpour S., Selamat J., Abdul Manap M.Y., Khatib A. & Abdull Razis A.F. (2018). Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different Solvent Extraction Systems. *Molecules.* 23(2): 402-415.
- Serino A. & Salazar G. (2019). Protective role of polyphenols against vascular inflammation, aging and cardiovascular disease. *Nutrients.* 11(1): 53.
- Sharifi-Rad J., Sharifi-Rad M., Salehi B., Iriti M., Roointan A., Mnayer D. & Afshari A. (2018). *In vitro* and *in vivo* assessment of free radical scavenging and antioxidant activities of *Veronica persica* Poir. *Cell Mol Biol.* 64(8):57-64.
- Shi G.J., Li Y., Cao Q.H., Wu H.X., Tang X.Y., Gao X.H. & Yang Y. (2019). *In vitro* and *invivo* evidence that quercetin protects against diabetes and its complications: A systematic review of the literature. *Biomed Pharmacother.* 109: 1085-1099.
- Sies H. (2019). Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. In *Stress: Physiology, Biochemistry and Pathology* (pp. 153-163). Academic Press.
- Singal A.K. & Shah V.H. (2019). Current trials and novel therapeutic targets for alcoholic hepatitis. *J Hepatol.* 70(2): 305-313.
- Singh A., Kukreti R., Saso L. & Kukreti S. (2019). Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecule.* 4(8): 1583.

- Singla R.K., Dubey A.K., Garg A., Sharma R.K., Fiorino M., Ameen S.M. & Al-Hiary M. (2019). Natural Polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *J AOAC Int.* **102**: 1-5.
- Sirivibulkovit K., Nouanthavong, S. & Sameenoi Y. (2018). based DPPH assay for antioxidant activity analysis. *Anal Sci.* **34(7)**: 795-800.
- Sirota R., Gorelik S., Harris R., Kohen R. & Kanner J. (2013). Coffee polyphenols protect human plasma from postprandial carbonyl modifications. *Mol Nutr Food Res.* **57**: 916-919.
- Smirnoff N. (2018). Ascorbic acid metabolism and functions: a comparison of plants and mammals. *Free Radic Biol Med.* **122**: 116-129.
- Srivastava A.K. (2018). Significance of medicinal plants in human life. In *Synthesis of Medicinal Agents from Plants* (pp. 1-24). Elsevier.
- Subramanian K., Sankaramourthy D., Gunasekaran M., Natural Products and Drug Discovery An Integrated Approach. 2018, 491-505.
- Sumathi S. & Anuradha R. (2016). *In vitro* antioxidant activity of methanolic extract of flower of *Couroupita guinensis* Aubl. *J Chem Pharm Res.* **8**:618-623.
- Sun Y., Zhu H., Wang J., Liu Z., Bi J. (2009). Isolation and purification of salvianolic acid A and salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography and comparison of their antioxidant activity. *J Chromatogr B.* **877(8-9)**: 733-737.
- Sung S., Kwon D., Um E. & Kim B. (2019). Could polyphenols help in the control of rheumatoid arthritis?. *Molecules.* **24(8)**: 1589.
- Suwalsky M., Villena F. & Gallardo M.J. (2015). *In vitro* protective effects of resveratrol against oxidative damage in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* **1848(1)**: 76-82.
- Tagousop C.N., Ekom S.E., Ngnokam D. & Voutquenne N.L. (2018). Antimicrobial activities of flavonoid glycosides from *Graptophyllum grandulosum* and their mechanism of antibacterial action. *BMC Complement Altern Med.* **18(1)**: 252-259.
- Takahashi O., Fukusato T. (2017). Animal Models of Liver Diseases, Michael Conn, In: *Animal Models for the Study of Human Disease* (Second Edition).
- Tanase C., Coşarcă S. & Muntean D.L. (2019). A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. *Molecules.* **24(6)**: 1182.
- Tang J., Zhao M., Wang Y., Kang G., Wu J., Zheng M. & Peng S. (2011). One single HPLC-PDA/ESI-MS/MS analysis to simultaneously determine 30 components of the aqueous extract of *Rabdosia rubescens*. *J Chromatogr B.* **879**: 2783-2793.
- Tantary S., Masood A., Bhat A.H., Dar K.B., Zargar M.A. & Ganie S.A. (2017). *In vitro* antioxidant and RBC membrane stabilization activity of *Euphorbia wallichii*. *Free Rad Antioxid.* **7(1)**: 13-22.
- Taso O.V., Philippou A., Moustogiannis A., Zevolis E. & Koutsilieris M. (2019). Lipid peroxidation products and their role in neurodegenerative diseases. *Ann Res Hosp* **3**: 1-10.
- Te H.S. (2019). Laboratory measurement of hepatic function. In *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set* (pp. 1398-1409).

- Teng H. & Chen L. (2019). Polyphenols and bioavailability: an update. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 59(13): 2040-2051.
- Tripodi A. (2015). Liver disease and hemostatic (Dys)function. *Semin Thromb Hemost.* 41: 462-467.
- Tsai, Y. C., Wang, Y. H., & Liu, Y. C. (2017). Overexpression of PCNA Attenuates Oxidative Stress-Caused Delay of Gap-Filling during Repair of UV-Induced DNA Damage. *J Nucleic Acids.* 2017: 8154646.
- Tu W., Wang H., Li S., Liu Q. & Sha H. (2019). The anti-Inflammatory and anti-oxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases. *Aging Disease.* 10(3): 637-648.
- Tuominen A. & Salminen J. P. (2017). Hydrolyzable tannins, flavonol glycosides, and phenolic acids show seasonal and ontogenic variation in *Geranium sylvaticum*. *J Agric Food Chem.* 65(31): 6387-6403.
- Tzima K., Brunton N. & Rai D. (2018). Qualitative and quantitative analysis of polyphenols in Lamiaceae plants-A Review. *Plants.* 7(2): 25-32.
- Ulrich K. & Jakob U. (2019). The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radical Biology and Medicine.* *Free Radic Biol Med.* 15(18): 32542-32547.
- Vallverdú-Queralt A., Regueiro J., Martínez-Huélamo M., Alvarenga J.F.R., Leal L.N. & Lamuela-Raventos R.M. (2014). Comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem.* 154: 299-307.
- Van Houten B., Santa-Gonzalez G.A. & Camargo M. (2018). DNA repair after oxidative stress: current challenges. *Curr Opin Toxicol.* 7: 9-16.
- Van Raamsdonk J.M., Vega I.E. & Brundin P. (2017). Oxidative stress in neurodegenerative disease: causation or association?. *Oncotarget.* 8: 10777-10778.
- Vulimiri S.V., Pratt M.M., Kulkarni S., Beedanagari S. & Mahadevan B. (2017). Reproductive and Developmental Toxicity of Solvents and Gases. In *Reproductive and Developmental Toxicology* (pp. 379-396). Academic Press.
- Wang T.Y., Li Q. & Bi K.S. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J Pharm Sci.* 13(1): 12-23.
- Warda K., Markouk M, Bekkouche K, Larhsini M, Abbad A, Romane A & Bouskraoui M. (2009). Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumoniae*. *Afr J Pharm Pharmacol.* 3(3): 101-104.
- Warris A., Ballou E.R. (2018). Oxidative responses and fungal infection biology. In *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press.
- Watson R.R., Preedy V.R., Zibadi S. (2018). Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease. 2 Eds., Academic press. 484
- Watson, R. R. (2 Ed.). (2018). Polyphenols in plants: isolation, purification and extract preparation. Academic Press.

- Weidner S., Król A., Karamać M. & Amarowicz R. (2018). Phenolic compounds and the antioxidant properties in seeds of green-and yellow-podded bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *CYTA J Food*. 16(1): 373-380.
- Williamson G., Kay C.D. & Crozier A. (2018). The bioavailability, transport, and bioactivity of dietary flavonoids: A review from a historical perspective. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 17(5): 1054-1112.
- Xiao J. & Hogger P. (2014). Advances in the pharmacokinetics of natural bioactive polyphenols. *Curr Drug Metab*. 15: 1-2.
- Xiong Y., Xiong Y., Zhou, S., Sun Y., Zhao Y., Ren X., Zhang Y. & Zhang N. (2017). Vitamin C and Ee supplements enhance the antioxidant capacity of erythrocytes obtained from aged *Rats Rejuvenation Res*. 20: 85-92.
- Xu D.P., Li Y., Meng X., Zhou T., Zhou Y., Zheng J., Zhang J.J. & Li H.B. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources. *Int J Mol Sci*.18(1): 96-107.
- Yahfoufi N., Alsadi N., Jambi M. & Matar C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. 10(11): 1618-1628.
- Yeo J. & Shahidi F. (2019). Critical re-evaluation of DPPH assay: Presence of pigments affects the results. *J Agric Food Chem*.67(26): 7526-7529.
- Yoo G., Kim M., Randy A., Son Y.J., Hong C.R. & Nho C.W. (2019). Lemon Balm extract and its major chemical compound, rosmarinic acid, alleviate damages of liver in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis (NASH)(P06-093-19). *Curr Dev Nutr*. 12-19.
- Younus H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci*. 12(3): 88.
- Yuan M., Liu Y., Xiao A., Leng J., Liao L., Ma L. & Liu L. (2019). The interaction of dietary flavonoids with xanthine oxidase *in vitro*: molecular property-binding affinity relationship aspects. *RSC Adv*. 9(19): 10781-10788.
- Yue Z., Zhang X., Yu Q., Liu L. & Zhou X. (2018). Cytochrome P450-dependent reactive oxygen species (ROS) production contributes to Mn3O4 nanoparticle-caused liver injury. *RSC Adv*. 8(65): 37307-37314.
- Zamzami M.A., Baothman O.A., Samy F. & Abo-Golayel M.K. (2019). Amelioration of CCl₄-induced hepatotoxicity in rabbits by *Lepidium sativum* Seeds. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019:1-17.
- Zhang C., Wang R., Zhang G., & Gong D. (2018). Mechanistic insights into the inhibition of quercetin on xanthine oxidase. *Int J Biol Macromol*. 112: 405-412.
- Zhang H. & Tsao R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42.
- Zhang Q.W., Lin L.G. & Ye W.C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin Med*. 13(1): 20-29.

Zhang Y., Miao H., Yan H., Sheng Y. & Ji L. (2018). Hepatoprotective effect of *Forsythiae fructus* water extract against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *J Ethnopharmacol.* **218**: 27-34.

Zhao R.Z., Jiang S., Zhang L. & Yu Z.B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *Int J Mol Med.* 44(1): 3-15.

Zielinski Z.A. & Pratt D.A. (2017). Lipid peroxidation: Kinetics, mechanisms, and products. *J Org Chem.* 82(6): 2817-2825.

Złotek U., Mikulska S., Nagajek M. & Świeca M. (2016). The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi J Biol Sci.* 23(5): 628-633.

Zuluaga M., Gueguen V., Pavon-Djavid G. & Letourneur D. (2017). Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. *Bioimpacts.* **7**: 1-3.

RESEARCH ARTICLE

Xanthine Oxidase Inhibition, *In-vitro* Antioxidant Activity and Antibacterial Effect of the Aerial Part Extracts of *Thymus pallidus* Coss

Abderrahim Benslama^{a,b}, Sabah Boumerfeg^{c,*}, Sana Aouachria^a, Thoraya Guemmaz^a, Lekhmici Arrar^a, Seddik Khenouf^d and Abderrahmene Baghiani^{a,*}

^aLaboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Nature and Life Sciences, University Ferhat Abbas-Setif 1, Algeria;

^bDepartment of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences, University of M'sila, M'sila, Algeria; ^cDepartment of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bordj Bou-Arredj, Algeria; ^dLaboratory of Phytotherapy Applied to Chronic Diseases, Faculty of Nature and Life Sciences, University Ferhat Abbas-Setif 1, Algeria

Abstract: Background: The Algerian medicinal plant *Thymus pallidus* Coss. is traditionally known to be used as an anti-infective, expectorant, healer of wounds and against inflammatory and gastrointestinal diseases.

Objective: The aim of the present study is to investigate the antioxidants and the antibacterial activities of the aerial part extracts of this plant.

Methods: Polyphenols extraction was performed with methanol 85%, followed by preliminary fractionation based on the polarity of the solvent. The extraction and fractionation process gave the crude extract (CrE), chloroform extract (ChE), ethyl acetate extract (EtAE) and aqueous extract (AqE). The antioxidant activity of extracts was evaluated using *in vitro* assays. While the antimicrobial activity was determined using disk diffusion method.

Results: Quantitative analysis of polyphenol and flavonoids showed that EtAE contains the highest amount ($P \leq 0.001$) with 495.12 ± 1.91 μg GAE/mg of extract and 97.25 ± 2.84 μg QE/mg of extract, for both polyphenols and flavonoids respectively. The results of the antioxidant activity of extracts showed that the EtAE exhibited the highest inhibition activity on XO ($\text{IC}_{50} = 51.6 \pm 0.2$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) compared to other extracts ($P \leq 0.001$). Moreover, the EtAE was the most effective fraction in free radical scavenging assay against ABTS radical and hydrogen peroxide ($\text{EC}_{50} = 3.21 \pm 0.03$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ and $\text{EC}_{50} = 12.12 \pm 0.05$ $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively) compared to other extracts ($P \leq 0.01$). Using β -carotene/linoleic acid bleaching assay, the AqE and ChE recorded a considerable inhibition effect on linoleic acid oxidation with a ratio of 81.81% and 80.86%, respectively. In the antimicrobial activity evaluation, the extracts exhibited moderate antibacterial activity against bacterial strain, with inhibition zone ranging from 07 to 14 mm. In addition, the EtAE showed a good action spectrum against six bacterial strains. In conclusion, the EtAE of *Thymus pallidus* showed good antioxidant activity and antibacterial effect.

Conclusion: The obtained results revealed the presence of a strong correlation between the antioxidant and antibacterial activities of the extract and its total phenolic content. Furthermore, they reported that the EtAE has a considerable antioxidant capacity. This can be considered as an alternative natural source of antioxidants used generally as additives in food and pharmaceutical preparation.

Keywords: Antibacterial, antioxidants, flavonoids, polyphenols, *T. pallidus*, xanthine oxidase (XO).

1. INTRODUCTION

Thymus pallidus has been used for generations by the Algerian population as medicines to treat several diseases.

Natural products contribute largely to the development of drug industry and constitute an affordable and available system of health care for people in the developing countries [1]. Oxidative stress produces free radicals and reactive oxygen species (ROS), which are formed under normal physiological conditions but become deleterious when they are not eliminated by endogenous systems. In fact, Free radicals are harmful for healthy cells, create harmful molecules and contribute to the degenerative processes related to aging and

*Address correspondence to these authors at the Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Nature and Life Sciences, University Ferhat Abbas-Setif 1, Algeria and Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bordj Bou-Arredj, Algeria; Tel: (+213) 661887412; E-mails: sabah_boumerfeg@yahoo.fr and baghianiab@hotmail.co.uk

diseases, such as cancer, cardiovascular disease and neurodegenerative disorders [2,3]. Xanthine oxidoreductase (XOR) has a crucial role in the purine degradation pathway, as it oxidizes hypo-xanthine to xanthine, leading to the production of uric acid. Xanthine oxidase (XO) is a form of xanthine oxidoreductase, an enzyme that generates ROS such as superoxide radicals (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) in vascular disease. XO transfers electrons to molecular oxygen readily and appears to be responsible for the majority of ROS production, whereas XDH prefers NAD^+ as an electron acceptor [4]. The antioxidants are capable of inhibiting the oxidation of biomolecules by removing free radical intermediates and inhibiting other oxidation reactions [5]. In recent years, multiple drug resistance by human pathogenic microorganisms has been developed due to indiscriminate use of commercial antimicrobial drugs commonly used in the treatment of infectious diseases. This situation forced scientists to search for new antimicrobial substances from various sources, like medicinal plants, which are a good source of novel antimicrobial chemotherapeutic agents [6]. The use of plant extracts and phytochemicals, with known antimicrobial properties, can be of great significance in therapeutic treatments [7]. Phenolic compounds or polyphenols are one of the principal classes of secondary metabolites of plant and their products. These compounds have aroused great interest due to their numerous beneficial effects toward human health. Polyphenols are subdivided into simple phenols, flavonoids and tannins. Polyphenols have several biological and pharmacological effects such as anti-inflammatory, antispasmodic, antiallergic, antidiabetic, antimicrobial and antiviral remedies [8,9]. The purpose of the present study is to investigate the antioxidants activity using *in vitro* assays such as xanthine oxidase (XO) inhibition, ABTS scavenging, Hydrogen peroxide scavenging and β -carotene-linoleic acid assay, as well as the antibacterial effect of *Thymus pallidus* aerial part extracts.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Chemicals and Reagents

The chemical reagents used were Aluminum chloride ($AlCl_3$), Ascorbic acid, Gallic acid, Quercetin, Sodium carbonate ($NaCO_3$), 2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonate (ABTS), β -carotene, Linoleic acid, Xanthine oxidase, Xanthine, Allopurinol, Hydrogen peroxide, Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$), Tween 40, 2,6-Di-*t*-butyl-4-methylphenol (BHT), Ampicillin and Folin-Ciocalteu reagent. These products were purchased from Sigma-Aldrich and Fluka (Germany).

2.2. Plant Material and Extraction

Thymus pallidus (locally named "El-Khiata") was collected in April, 2012 from Khelil, Bordj Bou Arreridj, Algeria. The plant was identified by Pr. Oudjih Bachir, Department of Agronomy, University of El-Hadj Lakhdar, Batna, Algeria. The whole plant was dried in shallow at room temperature for two weeks. The air-dried aerial parts were powdered using an electrical grinder. The

powdered material (100 g) was macerated for 5 days with 1 L of methanol:water 85:15 (v/v). The extract was then filtered and the solvent was removed to dryness under reduced pressure to afford the crude extract (CrE). The CrE was re-suspended in water and partitioned with solvents of increasing polarity. The CrE was successively extracted with chloroform and ethyl acetate to afford after concentration under reduced pressure using a rotary evaporator, the corresponding chloroform extract (ChE), ethyl acetate extract (EtAE) and the aqueous fraction (AqE). All extracts were stored in the dark at 4°C until use [10].

2.3. Total Phenolics and Flavonoids Content Determination

The total phenolic content (TPC) of *T. pallidus* extracts was measured using the Folin-Ciocalteu reagent described by Adjadj *et al.* [11], using gallic acid as standard. The amount of total phenol in extracts was expressed as μ g of gallic acid equivalent (GAE)/mg extract. Total flavonoid content (TFC) was quantified by the aluminum chloride ($AlCl_3$) reagent method described by Zerargui *et al.* [12]. Briefly, 1 ml of extract, dissolved in the corresponding solvent was added to 1 ml of $AlCl_3$ (2%). The absorbance was measured at 430 nm, after incubation for 10 min at room temperature. The flavonoids content was expressed as μ g quercetin equivalents (QE)/mg extract.

2.4. Measurement of Xanthine Oxidase Inhibition Activity

The effect of *T. pallidus* extracts on xanthine oxidase (XO) was examined spectrophotometrically at 295 nm following the production of uric acid [13]. Assays were performed at room temperature, in the presence of final concentration of 100 μ M of xanthine, in air saturated sodium phosphate buffer (50 mM, pH7.4) with various concentrations of *T. pallidus* extracts dissolved in phosphate buffer. The reaction was started by the addition of XO. The enzyme activity of the control sample was set at 100% activity. Allopurinol was used as a reference compound.

2.5. Hydrogen Peroxide Scavenging Effect of Plant Extracts

The ability of extracts to scavenge hydrogen peroxide (H_2O_2) was carried out according to Keser *et al.* [14]. A solution of H_2O_2 (40 mM) was prepared in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4). The concentration of H_2O_2 was determined spectrophotometrically. The absorbance was measured at 230 nm. Briefly, 3.4 ml of extract in phosphate buffer was added to 0.6 ml of H_2O_2 , and the absorbance was determined after 10 min against a blank solution containing phosphate buffer without H_2O_2 . The percentage of H_2O_2 scavenging was calculated as follows:

$$\text{Scavenging effect of } H_2O_2 \% = [(A_C - A_S) / A_C] \times 100$$

where A_C : control absorbance and A_S : absorbance in presence of sample (extract). The data are presented as mean of triplicate and the concentration required for a 50% (EC_{50}) effect of H_2O_2 scavenging was determined graphically.

Table 1. Total polyphenols and flavonoids contents in *T. pallidus* extracts. The values are expressed as mean \pm SD (n=3,4) and the comparison was realized against EtAE (***) $P \leq 0.001$. CrE: crude extract; ChE: chloroform extract; EtAE: ethyl acetate extract; AqE: aqueous extract.

Extract	Yields of Extraction (%)	Total Phenol Content ($\mu\text{g GAE/mg E}$)	Flavonoids Contents ($\mu\text{g QE/mg E}$)
CrE	13.04 \pm 1.15***	285.97 \pm 6.23***	44.99 \pm 2.29***
ChE	1.65 \pm 0.039***	167.66 \pm 1.91***	22.62 \pm 2.05***
EtAE	6.95 \pm 0.45	495.12 \pm 1.91	97.25 \pm 2.84
AqE	2.51 \pm 0.56***	233.83 \pm 6.23***	29.78 \pm 0.07***

2.6. β -carotene-linoleic Acid Bleaching Assay

The antioxidant capacity of *T. pallidus* extracts was determined by measuring the inhibition of the conjugated dienehydroperoxides arising from linoleic acid oxidation [12]. Briefly, 0.5 mg of β -carotene was dissolved in 1 ml of chloroform, and 25 μl of linoleic acid and 200 mg of Tween 40 were added in round-bottomed flask. The chloroform was removed under reduced pressure at 40°C, and 100 ml of oxygenated distilled water was added to the mixture under vigorous agitation to form an emulsion. A 2.5 ml aliquot of this emulsion was dispersed into test tubes and 350 μl portions of the antioxidant (extracts and BHT) prepared in methanol at 2 mg/ml concentrations were added. The absorbance was monitored for 48 h at 490 nm. The antioxidant activity (AA) of the sample extracts and standard was evaluated according to [15], in terms of bleaching of β -carotene using the following formula:

$$AA_t \% = [(A_0 / A_t) \times 100]$$

The antioxidant capacity of the extracts was compared with those of BHT and negative controls.

2.7. ABTS Cation Radical Scavenging Activity of Plant Extracts

The ABTS radical scavenging activity of the extract and each fraction was carried out according to Bouaziz *et al.* [16]. For the development of ABTS radicals, potassium persulfate (2.45 mM) solution was mixed with ABTS (7 mM) and incubated overnight in the dark to get a dark colored solution. The standard solution of ABTS was diluted by the addition of methanol to have an absorbance of 0.70 \pm 0.02 at 734 nm. An aliquot of 100 μl of extract or fraction was mixed with 1.9 ml of ABTS and the absorbance was recorded after 30 minute. Quercetin, Ascorbic acid and BHT were used as positive control molecules. The anti-radical activity of extracts was calculated according to the following formula:

$$\text{Scavenging effect \%} = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100$$

where A_c : control absorbance and A_s : absorbance in presence of sample (extract). The data are presented as mean of triplicate and the concentration required for a 50% (EC_{50}) reduction of ABTS radical was determined graphically.

2.8. Antibacterial Activity of Plant Extracts

The antibacterial activity of extracts was assessed by the disk diffusion method using bacterial cell suspension whose

concentration was equilibrated to a 0.5 McFarland standard [17]. The antibacterial activity was determined on the following bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 and *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Sterile paper disk (5 mm diameter) were impregnated with 20 μl of each extract dissolved in DMSO at 50 mg/ml (1 mg extract/disk). After incubation at 37 °C for 24 h, the zone of bacterial growth inhibition was measured. Standard ampicillin was included in the test as positive control (50 $\mu\text{g/disk}$). The results are reported as inhibition diameter zones in mm.

2.9. Statistical Analysis

Experimental results were expressed as mean \pm SD of triplicate. Data were analysed by Student's *t*-test to determine statistical significance. *p*-values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered as indicative of significance. The EC_{50} values were calculated from linear regression analysis. All statistical analysis and graphing of data were performed by GraphPad Prism software (version 7, La Jolla California, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1. Extraction Yields and Total Phenolic and Flavonoid Contents

The extraction procedure resulted in crude extract (CrE), chloroform extract (ChE), ethyl acetate extract (EtAE) and aqueous extract (AqE) with different yields (Table 1). The amount of total polyphenols in different extracts was expressed as μg of gallic acid equivalent/ mg extract. The data presented in Table 1 indicated that the amount of total phenolics was highest in the EtAE (495.12 \pm 1.91 $\mu\text{g GAE/mg}$ of extract). Moreover, the highest amount of flavonoids was recorded in the EtAE (97.25 \pm 2.84 $\mu\text{g QE/ mg}$ extract), whereas ChE contained the lowest amount of TPC and TFC.

Several extraction methods using different solvents to extract active compounds from plants were used. The yield of extraction varied according to the plant species, the organ used in the extraction, the drying conditions and the richness of each species with secondary metabolites [18]. Moreover, recovery of phenolic compounds also depends on the type of

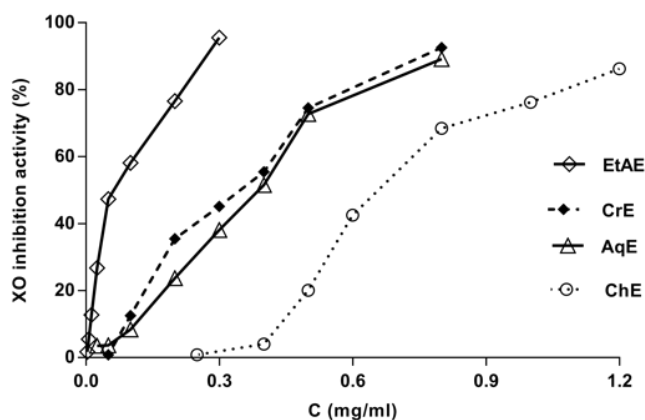


Fig. (1). Kinetic of bovine milk XO inhibition by *T. pallidus* extracts. Values were expressed as mean \pm SD of triplicate. (CrE: crude extract; ChE: chloroform extract; EtAE: ethyl acetate extract; AqE: aqueous extract).

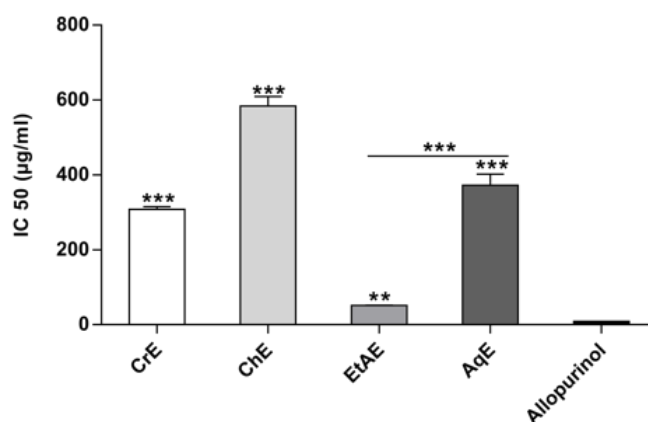


Fig. (2). IC₅₀, inhibitory concentration of *T. pallidus* extracts on XO. Results are mean \pm SD of triplicate. ***: $P \leq 0.001$ and **: $P \leq 0.01$. (CrE: crude extract; ChE: chloroform extract; EtAE: ethyl acetate extract; AqE: aqueous extract).

solvent used, its polarity and the solubility of the phenolic compounds in the extraction solvents [19]. Solvents used for extraction were chosen according to the polarity of the flavonoids being studied. The less polar solvents such as chloroform are particularly useful for the extraction of flavonoid aglycones, whilst the more polar solvents such as ethyl acetate are used for the flavonoid (1', 2'-OH) glycosides or anthocyanins. The aqueous fraction contained the flavonoid (3',4'-OH) glycosides [20].

3.2. Xanthine Oxidase Inhibition Activity of Plant Extracts

The effect of *T. pallidus* extracts on XO was examined spectrophotometrically at 295 nm following the production of uric acid [13]. CrE and different fractions of *T. pallidus* extracts inhibited XO in a concentration-dependent manner (Fig. 1). The most potent XO inhibitor was the EtAE with an IC₅₀ = 51.6 \pm 0.2 μ g/ml followed by CrE (IC₅₀ = 300.12 \pm 1.6 μ g/ml) then AqE (IC₅₀ = 370.65 \pm 3.4 μ g/ml). The *in vitro* inhibition of XO by extracts is moderate when compared to allopurinol (IC₅₀ = 8.74 \pm 0.15 μ g/ml) (Fig. 2).

Xanthine oxidase is the enzyme that utilizes hypoxanthine or xanthine as a substrate and O₂ as a cofactor to produce superoxide O₂⁻ and uric acid. It serves as an important

biological source of oxygen-derived free radicals that contribute to oxidative damage to living tissues [21]. Results showed a high correlation between XO inhibition activity and phenolic content in the extracts. Although many previous reports have suggested the existence of naturally occurring XO inhibitors ranging from flavonoids to a host of other natural plant products, several of these studies have used plants extracts [13,22]. Pauff and Hille [23] demonstrated that luteolin, silibinin, and quercetin inhibit xanthine oxidase and suggested that these compounds, or their derivatives, may be used in the development of clinically useful inhibitors of XO. Flavonoids, particularly quercetin and rutin can inhibit competitive XO [24].

3.3. ABTS Scavenging Activity of Plant Extracts

The anti-radical activity of extracts was estimated using ABTS radical cation decolorization assay reported by Bouaziz *et al.* [16]. The tested extracts were able to scavenge the ABTS radical with different EC₅₀ values (Fig. 3). Among them, the EtAE exhibited the highest scavenging capacity (EC₅₀ = 3.21 \pm 0.03 μ g/ml) which is significantly higher than other extracts and BHT (Fig. 3). The CrE and AqE present moderate scavenger activity against ABTS radical with EC₅₀ = 6.23 \pm 0.06 and 4.11 \pm 0.04 μ g/ml, respectively, when the

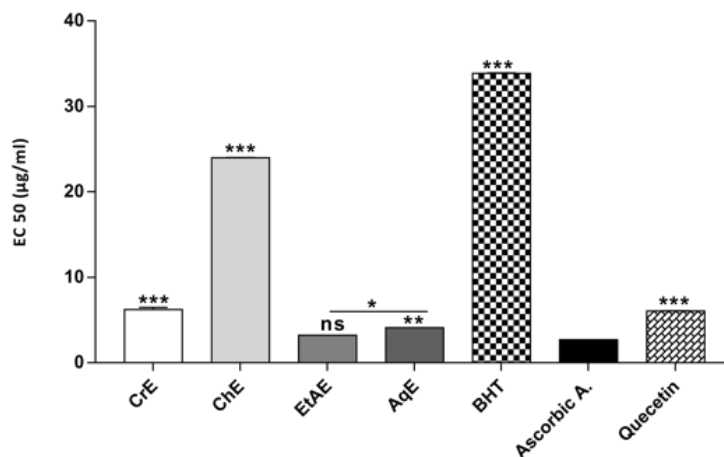


Fig. (3). Free radical scavenging activity of *T. pallidus* extracts in ABTS scavenging assay. Values were means \pm SD of triplicate (***: $P \leq 0.001$, **: $P \leq 0.01$, ns: $P > 0.05$). (CrE: crude extract; ChE: chloroform extract; EtAE: ethyl acetate extract; AqE: aqueous extract)

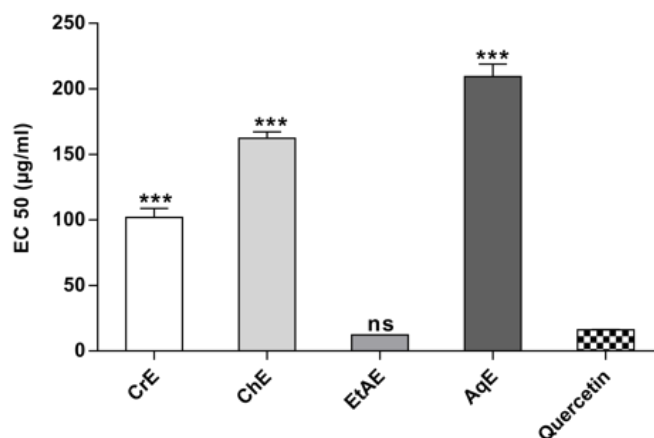


Fig. (4). Hydrogen peroxide scavenging activity of the *T. pallidus* extracts. Values were means \pm SD of triplicate (***: $P \leq 0.001$, **: $P \leq 0.01$, ns: $P > 0.05$). (CrE: crude extract; ChE: chloroform extract; EtAE: ethyl acetate extract; AqE: aqueous extract).

lower scavenging activity was recorded for ChE ($EC_{50} = 24.00 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$). In fact, the scavenging effect of extracts was not very far from used standards, ascorbic acid ($EC_{50} = 2.70 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$) and quercetin ($EC_{50} = 6.06 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$). The anti-radical capacity is very important to determine the antioxidant activity of compounds and molecules. Diverse assays are used to evaluate the antioxidant capacity of natural products from the plant. Chemical methods are based on the capacity of compounds to scavenge the synthetic free radicals [25]. Results showed a moderate correlation between the ABTS radical scavenging activity of extracts and their content in both polyphenols and flavonoids ($R^2 = 0.47$ and 0.77 , respectively). Such results suggest that the efficiency scavenging activity could be linked to polyphenols and flavonoids contents in the extract, and to the nature (structure) of these compounds. The mechanism of the reaction between antioxidant and ABTS radical depends on the structural conformation of the antioxidant [26]. The antiradical activity of natural antioxidants such as phenolic acid and flavonoids may be due to their richness in hydroxyl-ring. The spatial configuration and the number of OH group of flavonoid structures can influence different antioxidant mechanisms [27].

3.4. Hydrogen Peroxide Scavenging Potential of Plant Extracts

The ability of extracts to scavenge hydrogen peroxide was carried out [14]. All the extracts exhibited an efficient scavenging activity against hydrogen peroxide radicals (Fig. 4). The EtAE exhibited the highest scavenging activity ($EC_{50} = 12.12 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$) which is significantly higher than CrE and ChE ($EC_{50} = 101.83 \pm 4.04$ and $162.40 \pm 2.72 \mu\text{g/ml}$, respectively). A lower scavenging activity against H_2O_2 radical was recorded for AqE ($EC_{50} = 209.29 \pm 5.60 \mu\text{g/ml}$).

Hydrogen peroxide can be formed *in vivo* by various oxidizing enzymes such as superoxide dismutase. It can permeate through biological membranes slowly oxidizing the number of compounds, where it is used in the respiratory burst of activated phagocytes [28]. Although hydrogen peroxide itself is not very reactive, however, it can be sometimes highly toxic to cells in the presence of metals such as Fe^{+2} or Cu^{+2} . It can generate the highly reactive hydroxyl radical ($HO\cdot$) through the Fenton reaction [29]. A high correlation was found between hydrogen peroxide scavenging activity and the total amount of both polyphenols and flavonoids in the extracts ($R^2 = 0.89$ and 0.95 , respectively), indicating that

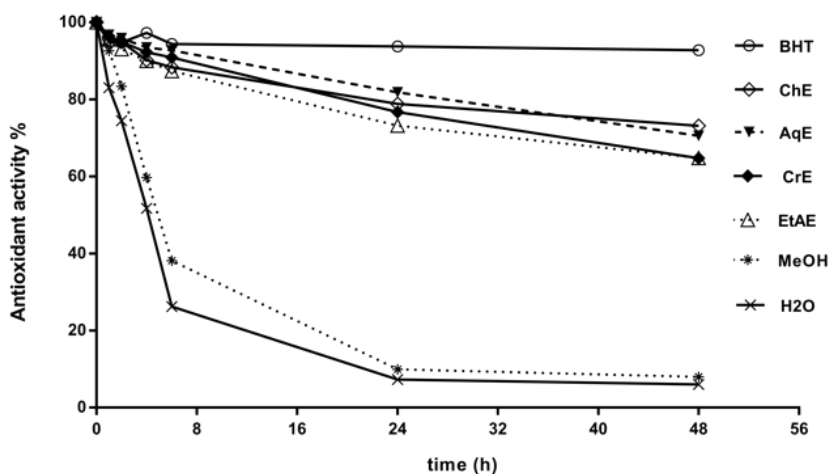


Fig. (5). Antioxidant activity of *T. pallidus* extracts in β -carotene bleaching assay for 48h. (CrE: crude extract; ChE: chloroform extract; EtAE: ethyl acetate extract; AqE: aqueous extract ; MeOH : methanol).

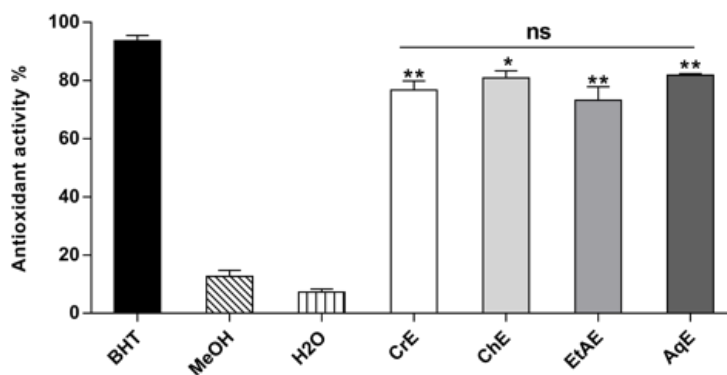


Fig. (6). Antioxidant activity of *T. pallidus* extracts in β -carotene-linoleic acid bleaching assay at 24 h. Values were means \pm SD of triplicate (***: $P \leq 0.001$, **: $P \leq 0.01$, ns: $P > 0.05$). (CrE: crude extract; ChE: chloroform extract; EtAE: ethyl acetate extract; AqE: aqueous extract; MeOH : methanol).

phenolic compounds play an important role in the beneficial effects of medicinal plants. This finding is in agreement with the work of Khaled-Khodja *et al.* [30], which demonstrated that the greatest phenolic content of the methanolic extract of some plants belonged to the Lamiaceae family. The scavenging of hydrogen peroxide is considered as an important feature of antioxidants. Accepting electrons in the presence of electron donors, hydrogen peroxide is decomposed into water [31]. Hydrogen peroxide scavenging activity especially of phenolic compounds is assigned to their electron-donating ability [32]. Recent studies have shown that phenolic compounds, particularly flavonoids are important antioxidants and hydrogen peroxide scavengers [33]. Their scavenging efficiency depends on the concentration of phenol and the number and location of the hydroxyl groups. However, anti-radical activity depends on the presence of a flavonol structure or free hydroxyl group at the C-4' position [34].

3.5. β -carotene-linoleic Acid Bleaching Assay

β -carotene bleaching assay is widely used to measure the antioxidant activity of plant extracts. The mechanism of β -carotene is a free radical mediated phenomenon resulting in the formation of hydroperoxides from linoleic acid. Linoleic

acid will become a linoleate-free radical with a hydrogen atom abstracted from one of its diallylic methylene groups [35]. The radical formed then attacks the highly unsaturated β -carotene molecules. When β -carotene molecules lose their double bonds by oxidation, the compound loses its chromophore and the orange color, which can be monitored spectrophotometrically. The presence of antioxidant molecules in different extracts can hinder the extent of β -carotene bleaching by neutralizing the linoleate-free radical and other free radicals formed in the system [09]. The antioxidant activity of various extracts of *T. pallidus* was measured by the bleaching of β -carotene-linoleic acid system (Fig. 5). All the extracts showed a remarkable antioxidant activity when compared to the synthetic antioxidant BHT which had a percentage inhibition of $93.73 \pm 1.24\%$ at the same concentration (2 mg/ml). The inhibition ratios of linoleic acid oxidation by AqE and ChE were close to each other ($81.81 \pm 1.60\%$ and $80.86 \pm 1.81\%$, respectively); whereas, CrE and EtAE were less effective with $76.68 \pm 1.25\%$ and $73.22 \pm 2.66\%$ respectively (Fig. 6).

It is interesting to notice the correlation between the phenolic content and the antioxidant activity of the plant extracts, since phenolic compounds contribute directly to anti-

Table 2. Antibacterial activity of *T. pallidus* extracts on pathogenic bacteria. Data are presented as inhibition zone (mm). - : inactive; Amp: ampicillin. ; CrE: crude extract; ChE: chloroform extract; EtAE: ethyl acetate extract; AqE: aqueous extract.

Strain	Extracts				Amp
	CrE	ChE	EtAE	AqE	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	-	-	7	-	11
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	11,33	10.5	11	-	18
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	-	-	-	-	13
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	9	-	9	-	30
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	8	-	21
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	8	-	-	09
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	-	-	-	-	25
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	13	11.66	12	12	15
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14	13	13.66	10.66	33

oxidant activity of the extract [36]. In this assay, there was a weak correlation between the inhibition of coupled auto-oxidation of linoleic acid and β -carotene and phenolic compounds contents. However, the literature includes studies reporting a weak correlation between total phenolic and flavonoids contents and antioxidant activity of plants extracts [37]. This matter suggests that not only the amount of phenolic compounds affects the inhibition of β -carotene bleaching but also their structural nature. In fact, some authors reported possible synergism between polyphenolic compounds and other components present in the extracts may contribute to its overall antioxidant activity [38]. A more comprehensive study of the antioxidant activities of 42 flavonoids, using the β -carotene bleaching method was reported, in which linoleic acid was oxidized by heat treatment. Substitution of 3-OH by a methyl or glycosyl group completely abolished the activity of quercetin and kaempferol against β -carotene oxidation [34].

3.6. Antibacterial Activity of Plant Extracts

The antibacterial activity of extracts was assessed against ten bacterial strains by the disk diffusion method. At 1 mg extract/disk, no activity was noticed against *P. mirabilis*, *C. freundii* and *P. aeruginosa*. The results showed that the EtAE and CrE exhibited moderate inhibitory effect against the Gram positive bacteria: *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis* and *S. typhimurium* with inhibition zone ranging from 7 to 14 mm (Table 2).

The antibacterial effect of extracts can be due to various chemical substances contained in the extract such as essential oils, flavonoids, polyphenols, saponins, tannins, alkaloids and terpenoids [39]. Plant-derived products have demonstrated antibacterial activity and can inhibit bacterial growth through numerous different mechanisms. Mecha-

nisms responsible for the toxicity of polyphenols to microorganisms include enzymatic inhibition by oxidized compounds, probably *via* reaction with sulfhydryl groups or by non-specific interactions with the proteins [39]. Destabilization of the cytoplasmic membrane makes it permeable, inhibition of extracellular bacterial enzymes, direct action on bacterial metabolism and deprivation of substrates required for bacterial growth. Especially essential mineral micronutrients such as iron and zinc (*via* the property of metal chelation) are probable mechanisms of proanthocyanidins in the inhibition of bacteria [41].

CONCLUSION

This study demonstrated that the extracts of *T. pallidus* have considerable antioxidant and antibacterial activities. The results indicated that the EtAE has important biological activities manifested in xanthine oxidase inhibition, free radical scavenging and bacterial growth inhibition. The EtAE of this plant could be considered as a natural alternative source for food, pharmaceutical and medicine sectors, in view of the potential use of EtAE in therapeutic benefits and bioactive compounds warrant for further *in vitro* and *in vivo* investigations.

LIST OF ABBREVIATIONS

- AqE = Aqueous Extract
- ChE = Chloroform Extract
- CrE = Crud Extract
- EtAE = Ethyl Acetate Extract
- GAE = Gallic Acid Equivalent
- QE = Quercetin Equivalent

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are the basis of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Algerian ministry of higher Education and Scientific Research (MERS). We would like to thank Pr. Oudjihh Bachir, Department of agronomy, Batna University, Algeria, for the identification of the plant material.

REFERENCES

- Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Asp Med* 2006; 27: 1-93.
- Siti HN, Kamisah Y, Kamsiaha J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vasc Pharmacol* 2015; 71: 40-56.
- Halliwel B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1147-50.
- Giulia Battelli M, Letizia Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A. Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 1-8
- Choe E, Min B. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2009; 8: 345-358.
- Taylor PW, Stapleton PD, Paul-Luzio J. New ways to treat bacterial infections. *Drug Discov Today* 2002; 7: 1086-1091.
- Pooja D, Gupta, Tannaz J, Birdi. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *J Ayurveda Integr Med* 2017; 8: 4266-275.
- Afzal M, Safer AM, Menon M. Green tea polyphenols and their potential role in health and disease. *Inflammopharmacology* 2015; 3: 151-161.
- Rasouli H, Farzaei MH, Khodarahmi R. Polyphenols and their benefits: A review. *Int J Food Prop* 2017; 20: 1700-1741.
- Ameni D, Baghiani A, Boumerfeg B, Dahamna D, Khennouf S, Abu Zarga MH, Arrar L. Phytochemical profiles, antioxidant capacity and protective effect against AAPH-induced mouse erythrocyte damage by *Daphne gnidium* L. Shoots extracts. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2015;7: 148-156.
- Adadj M, Baghiani A, Boumerfeg B, Khennouf S, Abu, Charef N., Khennouf S, Arrar L. and Mohammad S. Mubarak MS. Protective effect of *Paronychia argentea* L. On acetic acid induced ulcerative colitis in mice by regulating antioxidant parameters and inflammatory markers. *Der Pharma Chemica* 2016; 8: 207-218.
- Zerargui F, Boumerfeg S, Charef N, Baghiani A, Djarmouni M, Khennouf S, Arrar L, Abu Zarga MH, Mubarak MS. Antioxidant potentials and xanthine oxidase inhibitory effect of two furanocoumarins isolated from *Tamus communis* L. *Med Chem.* 2015; 11: 506-513.
- Boumerfeg S, Baghiani A, Djarmouni M, Ameni D, Adadj M, Belkhir F, Charef N, Khennouf S, Arrar L. Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. extracts. *Chin Med J* 2012; 3: 30-41.
- Keser S, Celik S, Turkoglu S, Yilmaz Ö, Turkoglu I. Hydrogen peroxide radical scavenging and total antioxidant activity of Hawthorn. *Chem J* 2012; 02 : 9-12.
- Ismail A, Siew Hong T. Antioxidant activity of selected commercial seaweeds. *Mal J Nutr* 2002; 8(2): 167-177.
- Bouaziz A, khennouf S, Abu Zarga HM, Abdalla S, Baghiani A, Charef N. Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis* L. growing in Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015; 5(1): 19-28.
- Benslama A, Harrar A, Gul F, Demirtas I. Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of *Zizyphus lotus* L. Leaves extracts. *Nat Prod J* 2017; 7(4): 316-322.
- Iloki-Assanga SB, Lewis-Lujan LM, Lara-Espinoza CL, Gil-Salido AA, Fernandez-Angulo D, Rubio-Pino JL, Haines DD. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Res Notes* 2015; 8: 2-14.
- Sepahpour S, Selamat J, Abdull Manap MT, Khatib A, Abdull Razis AF. Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems. *Molecules* 2018; 23: 402-419.
- Belkhir F, Baghiani A, Abu Zarga MH, Arrar L. Investigation of antihemolytic, xanthine oxidase inhibition, antioxidant and antimicrobial properties of *Salvia verbenaca* L. Aerial part extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2017; 14: 273-281.
- Baghiani A, Boumerfeg S, Belkhir F, Khennouf S, Charef N, Harzallah D, Arrar L, Attia AM. Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L. extracts grow wild in Algeria flora. *Comunicata Scientiae* 2010; 2: 128-136.
- Hudaib MM, Tawaha KA, Mohammad MK, Assaf AM, Issa AY, Alali FQ et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of the methanolic extracts of selected Jordanian medicinal plants. *Phcog Mag* 2011; 7(28): 320-324.
- Pauff JM, Hille R. Inhibition studies of bovine xanthine oxidase by luteolin, silibinin, quercetin, and curcumin. *J Nat Prod* 2009; 72: 725-731.
- Huang J, Wang S, Zhu M, Chen J, Zhu X. Effects of genistein, apigenin, quercetin, rutin and astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 1943-1947.
- Craft BD, Kerrihard AL, Amarowicz R, Pegg RB Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment. *Comp Rev Food Sci Food Saf.* 2012; 11, 148-173.
- Shalaby EA, Shanab SM. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Ind J Geo-Marin Sci* 2013; 42: 556-564.
- Huyut Z, Beydemir Ş, Gülçin İ. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int* 2017; 2017: 1-10.
- Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev* 2014; 94: 329-354.
- Halliwel B, Gutteridge JMC. 2007. Free radicals in biology and medicine. 4th Edition, Oxford University Press, New York.
- Khaled-Khodja NL, Makhlof, K. Madani, Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Indus Crops Prod* 2014; 61: 441-451.
- Arvin E, Pedersen LF. Hydrogen peroxide decomposition kinetics in aquaculture water. *Aquac Eng* 2015; 64: 1-7.
- Fernando CD, Soysa P. Optimized enzymatic colorimetric assay for determination of hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging activity of plant extracts. *MethodsX* 2015; 2: 283-291.
- Tremel J, Šmejkal K. Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2016; 15: 720-738.
- Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 2774-2779.
- Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 9130976.
- Hatamia T, Emamic SA, Miraghaee SS, Mojarrab M. Total Phenolic Contents and Antioxidant activities of different extracts and

- fractions from the aerial parts of *Artemisia biennis* willd. Iran J Pharm Res 2014; 13: 551-558.
- [37] Kahkonen MP, Hopia AI, Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity. J Agric Food Chem 2001; 49: 4076-4082.
- [38] Ordonez AL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swart extracts. Food Chem 2006; 97: 452-458.
- [39] Parekh J, Nair R, Chanda S. Preliminary screening of some folklore medicinal plants from western India for potential antimicrobial activity. Indian J Pharmacol 2005; 37: 408-409.
- [40] Compean KL, Ynalvez RA. Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A review. Res J Med Plan. 2014; 8: 204-213.
- [41] Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. Curr Opin Biotechnol 2012; 23: 174-181.

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

نبات *Thymus pallidus* الذي ينتمي إلى عائلة Lamiaceae والمسماة محلياً "الخيطة"، هو نبات طبي يستخدم على نطاق واسع في الغذاء والطب الشعبي الجزائري. تحدف هذه الدراسة إلى تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والنشاط الوافي للكبد، وكذلك التأثير السام للمستخلصات النباتية. أدى استخلاص البوليفينول من الجزء الهوائي من النبات إلى الحصول على المستخلص الخام (E.Br) الذي تمت بواسطة مذيبات متزايدة القطبية إلى مستخلص الكورفوروم (E.Ch)، مستخلص الإيثيل أسيتات (E.EtA) والمستخلص المائي (E.Aq). تم تقدير المحتوى الكلي من الفينولات والفلافونيدات بطرق القياس الطيفية. أظهرت النتائج أن E.EtA يحتوي على أكبر كمية من الفينولات والفلافونويدات بمعدل 1.91 ± 495.12 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك (GAE)/مغ مستخلص و 2.84 ± 97.25 ميكروغرام مكافئ كيرستين (QE)/مغ مستخلص، على التوالي. تم التحليل الكيميائي لكل من E.Br و E.EtA و E.Aq بواسطة تقنية HPLC-DAD-MS/MS. تم تحديد حوالي 49 مركباً، حيث تشمل المركبات الفينولية الموجودة في المستخلصات على أحماض هيدروكسي بينزويك وحمض الهيدروكسيسيناميك ومشتقاته والفلافونويدات. كانت المركبات الفينولية الرئيسية هي حمض روزمارينيك، حمض السلفيانول والليوتولين. تم تحديد نشاط المستخلصات المضاد للأكسدة *in vitro* خلال عدة اختبارات. أظهر اختبار DPPH أن E.EtA امتلك أعلى تأثير كاسح للجذور الحرة، كما أظهر نفس المستخلص أيضاً نشاطاً محلياً قوياً (53.38 ميكروغرام EDTA/مغ مستخلص)، نشاط إرجاعياً فعالاً (929.73 ميكروغرام من حمض الأسكوربيك/مغ مستخلص) ونشاط قوي ضد الانحلال الدموي ($HT_{50}=109.44$ دقيقة). أثناء دراسة السمية فوق الحادة، لم تؤدي معالجة الفئران بـ E.Br و E.EtA بجرعات 50، 200، 500، 1000 و 2000 مغ/كغ من وزن الجسم/يوم لمدة 21 يوم إلى ظهور أي علامات واضحة للسمية في الفئران، حيث كانت DL_{50} أكبر من 2000 مغ/كغ. من ناحية أخرى، أظهر تقييم نشاط المستخلصات المضادة للأكسدة *in vivo* أن معالجة الفئران Swiss albinos بـ E.Br و E.EtA بجرعة 500 مغ/كغ من وزن الجسم/يوم لمدة 21 يرفع من مستوى GSH ويخفض من مستوى MDA في الكبد والدماغ. بالإضافة إلى ذلك، زيادة في نشاط إنزيم CAT في الكلى. أظهرت دراسة التأثير الوقائي لـ E.Br ضد السمية الكبدية الناتجة عن CCl_4 في الفئران، أن المعالجة اليومية لهذه الأخيرة بجرعات 100، 250 و 500 مغ/كغ لمدة ستة أيام بخفض بشكل ملحوظ من نشاط إنزيمات ALT، AST و ALP و يقلل من مستويات MDA و يرفع من مستوى GSH. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من هذه الدراسة أن E.Br و E.EtA لنبات *Thymus pallidus* يملكان نشاطاً قوياً مضاداً للأكسدة *in vitro* و *in vivo*، كما أن التأثير الوقائي الكبدية لـ E.Br كان واضحاً. بالإضافة إلى ذلك، مستخلصات *Thymus pallidus* ليست سامة بجرعة ≤ 2000 مغ/كغ، مما يشير بوضوح إلى الفوائد الصحية المحتملة للنبات في المستحضرات الغذائية والصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: *Thymus pallidus*، عديدات الفينول، النشاطية المضادة للأكسدة، السمية فوق الحادة، التأثير الوقائي الكبدية، HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

Résumé

Thymus pallidus de la famille des Lamiaceae appelé localement « Khyata », est une plante médicinale largement utilisée à des fins alimentaires et en médecine traditionnelle en Algérie. La présente étude vise à évaluer l'activité antioxydante, et hépatoprotectrice, ainsi que l'effet toxique des extraits de la plante *Thymus pallidus* et leur caractérisation phytochimique. L'extraction des polyphénols de la partie aérienne de la plante étudiée suivie d'un fractionnement selon la polarité des solvants a abouti à l'extrait brut (E.Br) et ses fractions; l'extrait de chloroforme (E.Ch), l'extrait d'éthyle d'acétate (E.EtA) et l'extrait aqueux (E.Aq). La teneur en phénols totaux et en flavonoïdes a été quantifiée par des méthodes colorimétriques. Les résultats ont montré que la plus grande quantité de phénols totaux et de flavonoïdes a été trouvée dans E.EtA avec un taux de 495.12 ± 1.91 μg équivalent d'acide gallique (GAE)/mg d'extrait et 97.25 ± 2.84 μg équivalent de quercétine (QE)/mg d'extrait, respectivement. L'analyse par HPLC-DAD-MS/MS a été utilisée pour établir le profil chimique de E.Br, E.EtA et E.Aq, dont 49 composés ont été identifiés par des méthodes spectrométriques. Les composés phénoliques présents dans les extraits sont les acides hydroxybenzoïques, l'acide hydroxycinnamique, les oligomères d'acide hydroxycinnamique l'acide rosmarinique, l'acide salvianolique et leuteolin. L'activité antioxydante *in vitro* des extraits a été déterminée par plusieurs essais. Le test de piégeage de DPPH a montré que l'effet antiradicalaire le plus élevé est celui de l'E.EtA. Cet extrait a montré également une forte activité chélatrice ($53,38$ μg EDTA/mg d'extrait), un pouvoir réducteur puissant ($929,73$ μg acide ascorbique/mg extrait) et une activité anti-hémolytique très importante ($HT_{50}=109,44$ min). Dans l'étude de la toxicité subaiguë, l'administration de l'E.Br et l'E.EtA à des souris Swiss albinos par gavage à des doses de 50, 200, 500, 1000 et 2000 mg/kg/jour pendant 21 jours n'a induit aucun signe visible de toxicité chez les souris testés dont la DL_{50} déterminée est supérieure à 2000 mg/kg. D'autre part l'évaluation de l'activité antioxydante *in vivo* a montré que l'administration de l'E.Br et l'E.EtA à des doses de 500 mg/kg/jour pendant 21 jours a augmenté le niveau du GSH et a diminué le taux de MDA dans le foie et le cerveau. De plus cette administration a augmenté significativement l'activité de CAT dans les reins. Par ailleurs l'étude de l'effet hépatoprotecteur d'une supplémentation quotidienne d'E.Br à des doses de 100, 250 et 500 mg/kg/jour pendant six jours chez les souris contre CCl_4 a montré que la dose 500 mg/kg a diminué significativement l'ALT, AST, ALP et MDA et a augmenté le CAT et le taux de GSH. Les résultats obtenus de cette étude ont révélé que l'E.Br et l'E.EtA de *Thymus pallidus*, possèdent une activité antioxydante puissante à la fois *in vitro* et *in vivo* et que l'effet hépatoprotecteur s'est amélioré par suite à une supplémentation de E.Br. De plus, *Thymus pallidus*, était non toxique en administration aiguë de leur extraits E.Br et E.EtA à des doses ≤ 2000 mg/Kg, ce qui indique clairement les bénéfices potentiels de la plante pour la santé dans les préparations alimentaires et pharmaceutiques.

Mots-clés: *Thymus pallidus*, Composés phénoliques, Activité antioxydante, Toxicité subaiguë, Activité hépatoprotectrice, HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

Abstract

Thymus pallidus, belong to Lamiaceae Family, locally named « Khyata », is a medicinal plant widely used in food and Algerian folk medicine. The present study aims to assess the antioxidant and hepatoprotective activities, as well as the toxic effect of plant extracts. The extraction of the polyphenols from the aerial parts of the studied plant and its fractionation resulted in the crude methanolic extract (E.Br); chloroform extract (E.Ch), ethyl acetate extract (E.EtA) and aqueous extract (E.Aq) according to the polarity of the solvents used. Total phenols and flavonoids content were quantified by colorimetric methods. Results showed that E.EtA recorded the greatest amount of total phenols and flavonoids (495.12 ± 1.91 μg gallic acid equivalent (GAE)/mg of extract and 97.25 ± 2.84 μg quercetin equivalent (QE)/mg extract, respectively). Using HPLC-DAD-MS/MS analysis to establish the chemical profile of E.Br, E.EtA and E.Aq; 49 compounds were identified. The major phenolic compounds present in the extracts were hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acid, oligomers of hydroxycinnamic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid and leuteolin. The *in vitro* antioxidant activity of the extracts has been determined by several tests. DPPH test has shown that the highest scavenging effect was that of E.EtA. The same extract has also showed a strong chelating activity (53.38 μg EDTA/mg of extract), a powerful reducing power (929.73 μg ascorbic acid/mg extract) and a very significant anti-hemolytic property ($HT_{50}=109.44$ min). In sub-acute toxicity study, the gavage of Swiss albinos mice by E.Br and E.EtA at doses of 50, 200, 500, 1000 and 2000 mg/kg/day for 21 days did not induced any visible sign of toxicity or mortality. Evaluation of the antioxidant activity *in vivo* has shown that the administration of E.Br and E.EtA at doses of 500 mg/kg/day for 21 days increased the level of GSH and decreased the level of MDA in the liver and brain. Moreover, this administration increased the activity of CAT in the kidneys. In addition, the study of the hepatoprotective effect of E.Br against CCl_4 -induced hepatotoxicity showed that the daily treatment of the mice at doses of 100, 250 and 500 mg/kg for six days, reduce the activity of ALT, AST and ALP, decrease the levels of MDA and increase the GSH level. The results obtained from this study showed that E.Br and E.EtA of *Thymus pallidus* had a strong antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*, and the hepatoprotective effect of E.Br was evident. Additionally, *Thymus pallidus* extracts are not toxic at a dose of $2000 \leq$ mg/kg, which clearly indicates the potential health benefits of the plant in food and pharmaceutical preparations.

Keywords: *Thymus pallidus*, Phenolic compounds, Antioxidant activity, Sub-acute toxicity, Hepatoprotective effect, HPLC-DAD-ESI-MS/MS.