

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

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

N° d'ordre : 78/D3C/2021

N° de série : 04/BA/2021



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : Biotechnologie et Biologie de l'Environnement
Option : Physio-toxicologie Cellulaire

Présentée et soutenue par :

Aissous Imen

Intitulée:

**L'effet protecteur de l'extrait butanolique de la plante
Centaurea maroccana contre la neurotoxicité induite par le
cisplatine chez les souris.**

Membres de jury :

Président : Lalaoui Korichi	Professeur	Université des Frères Mentouri Constantine 1.
Directeur de thèse : Benrebai Mouad	MCA	Université des Frères Mentouri Constantine 1.
Examinatrice : Dahamna Saliha	Professeur	Université Ferhat Abbas Sétif 1.
Examineur : Menad Ahmed	Professeur	Université des Frères Mentouri Constantine 1.

**Année universitaire :
2020/2021**



Remerciements

Premièrement, je remercie le Dieu, le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force, la patience et le courage pour réaliser et achever ce modeste travail.

Mes sincères remerciements s'adressent :

À Mr Benrebai M., Maître de conférences (A) à l'Université de Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté la direction de mon travail et pour sa patience, sa générosité scientifique et sa compréhension.

*Aux membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont octroyés d'avoir acceptés l'examen de ce travail, à savoir Mr le professeur **Lalaoui K.**, Mr le professeur **Maned A.**, et Mme le professeur **Dahamna S.***

*À Mme **Ammedah S.**, Professeur à l'Université frères Mentouri, Constantine 1, pour son aide, ses conseils, et sa générosité scientifique et l'intérêt qu'elle a porté à mon travail. Recevez mon profond respect.*

*Mes remerciements iront au professeur Mr le **Dr. Bensouici C.**, de Centre de recherche en biotechnologie, Constantine, pour leur aide et leur conseil précieux.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance aux professeurs **Mr Ramazan E.** et **Mr Erçan C.** de l'université Tokat Gaziosmanpasa, Tokat, Türkiye, je tiens à leur exprimer mes plus sincères remerciements pour l'intérêt qu'ils m'ont accordés, leur accueil chaleureux, la confiance témoignée et leur soutien permanent accordé durant mon séjour.*

*Un grand merci à ma camarade et sœur **Bioud Kenza** qui m'a toujours soutenue, encouragée et conseillée dans toutes les situations.*

Je remercie aussi tous ceux qui mon aider de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

IMEN.



Dédicace

Je dédie ce travail:

À mes très chers parents ma mère mon père

Pour leur patience, leur amour et leur soutien.

*À mes frères Malouk, Fatch et leurs épouses, à mon très
mignon frère Hachem.*

*À mes sœurs Soulef, Salma, à ma très chère sœur
Wassila pour son soutien et ses encouragements, ainsi qu'à
leurs maris.*

À tous les petits-enfants de ma famille.

À mes chères amies Amina B, Ahlem Z et Maya.

Amen.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Première partie : Synthèse bibliographique

I. Le cisplatine.....4

1. La chimie du cisplatine.....4

2. Pharmacocinétique du cisplatine.....4

3. Pharmacodynamique du cisplatine.....5

4. Les principaux mécanismes d'action du cisplatine.....6

5.1. L'interaction avec l'ADN.....6

5.2.L'apoptose.....6

5.3. Le cisplatine et les espèces réactives de l'oxygène (ROS).....7

5.4. Le cisplatine et le dysfonctionnement mitochondrial.....7

II. Le système nerveux.....8

1. Le système nerveux central (SNC).....8

1.1. L'organisation macroscopique.....8

1.1.1. L'encéphale.....8

1.1.1.1. Le cerveau.....8

1.1.1.2. Le cervelet.....9

1.1.1.3.Le tronc cérébral.....9

1.1.2. La moelle épinière.....9

1.2. L'organisation microscopique.....9

1.2.1. Le neurone.....9

1.2.2. Cellules gliales, non neuronales.....10

2. Le système nerveux périphérique (SNP)10

2.1. Système nerveux somatique.....10

2.2. Système nerveux autonome.....10

3. Synapses et neurotransmetteurs.....11

III. La Neurotoxicité.....13

1. La neurotoxicité médicamenteuse.....13

2. Les médicaments de la chimiothérapie.....13

2.1. Le mécanisme de la neurotoxicité des agents chimiothérapeutiques.....	14
3. La neurotoxicité du cisplatine.....	14
IV. Le stress oxydatif et système antioxydant.....	15
1. Les radicaux libres de la biologie.....	15
1.1. Les différents types des radicaux libres oxygénés (ROS).....	16
1.1.1. Les ROS radicalaires.....	16
1.1.2. Les ROS non radicalaires.....	17
1.2. Les sources de production des ROS.....	18
1.2.1. Les ROS exogènes.....	18
1.2.2. Les ROS endogènes ou cellulaires.....	18
1.3. Dommages moléculaires induits par les ROS.....	20
1.3.1. Dommages des lipides membranaires.....	21
1.3.2. Dommages de l'ADN.....	21
1.3.3. Altérations des protéines.....	21
2. Stress oxydant et pathologies humaines.....	22
3. le système de protection antioxydant.....	23
3.1. Les antioxydants.....	23
3.2. Les différents types des antioxydants.....	23
3.2.1. Les antioxydants enzymatiques.....	23
3.2.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	25
V. Les polyphénols.....	28
1. Définition.....	28
2. Classification chimique des polyphénols.....	28
2.1. Les flavonoïdes.....	29
2.2. Les stilbènes.....	30
2.3. Les lignanes.....	30
2.4. Les acides phénoliques.....	30
3. Effets biologiques des polyphénols.....	31
3.1. L'activité antioxydante.....	31
3.2. Activité anti microbienne.....	31
3.3. Activité anti inflammatoire.....	32
3.4. Activité anti cancérogène.....	32
3.5. Activité neuroprotectrice.....	32
4. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Centaurea</i>	32

4.1. Le genre <i>Centaurea</i>	32
4.2. Description botanique du genre <i>Centaurea</i>	33
4.3. L'espèce <i>Centaurea maroccana</i>	34
4.4. Composition chimique du genre <i>Centaurea</i>	34
4.5. Les vertus médicinales et les propriétés biologiques des <i>Centaurees</i>	34
Deuxième partie : Etude expérimentale	
I. Matériel et méthodes.....	37
1. Etude <i>in vitro</i>	37
1.1. Matériel biologique végétal.....	37
1.2. Préparation de l'extrait.....	37
1.3. Etude phyto-chimique.....	39
1.3.1. Détermination de la teneur totale en phénols.....	39
1.3.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes.....	39
1.3.3. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).....	39
1.4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	40
1.4.1. Effet anti-radicalaire par le test au DPPH'.....	40
1.4.2. Essai de décoloration du radical cation ABTS ^{•+}	40
1.4.3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	41
1.4.4. Test de blanchissement de β -carotène.....	41
1.4.5. L'activité de piégeage des radicaux superoxydes.....	42
1.4.6. Dosage de pouvoir réducteur.....	42
1.5. Évaluation <i>in vitro</i> de la propriété neuroprotectrice de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C.</i> <i>maroccana</i>	42
1.5.1. Activité d'inhibition de la peroxydation lipidique	42
1.5.2. L'activité d'inhibition de l'acétylcholine estérase	43
1.6. Détermination de l'activité antiproliférative <i>in vitro</i> de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C.</i> <i>maroccana</i>	44
1.6.1. Culture des cellules.....	44
1.6.2. Test de cytotoxicité.....	44
2. Etude <i>in vivo</i>	45
2.1. Évaluation de l'activité neuroprotectrice de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C. maroccana</i> contre la neurotoxicité induite par le cisplatine	45
2.1.1. Induction et traitement de la neurotoxicité des souris.....	45

2.1.2. Le sacrifice et la dissection des souris.....	45
2.1.3. Préparation de la fraction cytosolique et mitochondriale.....	45
2.2. Dosages biochimiques.....	48
2.2.1. Dosage du lactate déshydrogénase.....	48
2.2.2. Dosage de l'activité de l'acétylcholine estérase.....	48
2.3. Détermination du statut oxydatif.....	48
2.3.1. La peroxydation lipidique.....	48
2.3.2. Dosage du glutathion réduit.....	49
2.3.3. Dosage de la glutathion-S- transférase.....	49
2.3.4. Dosage de la glutathion peroxydase.....	49
2.3.5. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase.....	50
2.3.6. Dosage du superoxyde dismutase.....	50
2.4. Détermination de la capacité antioxydante totale.....	50
2.5. Etude histologique.....	51
2.6. Analyse statistique.....	51
II. Résultats.....	52
II.1. Résultats de l'étude expérimentale <i>in vitro</i>	52
1. Etude phyto-chimique.....	52
1.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....	52
1.2. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.....	52
2. L'activité antioxydante de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C. maroccana</i>	54
2.1. L'effet anti-radicalaire par le test au DPPH [•]	55
2.2. L'activité du Piégeage de radical cation ABTS ^{•+}	55
2.3. L'activité antioxydante (CUPRAC).....	56
2.4. L'activité de blanchissement de la β -carotène.....	57
2.5. L'activité de neutralisation des radicaux superoxydes par le DMSO alcalin.....	57
2.6. Le pouvoir réducteur.....	58
3. Propriété neuroprotectrice de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C. maroccana</i>	59
3.1. L'activité d'inhibition de la peroxydation lipidique.....	59
3.2. L'activité inhibitrice de l'acétylcholine estérase (AChE).....	59
4. L'activité antiproliférative du l'extrait <i>n</i> - butanol de <i>C. maroccana</i>	60
II.2. Résultats de l'étude expérimentale <i>in vivo</i> de l'activité neuroprotectrice du BECM contre la neurotoxicité induite par le cisplatine.....	61

1. Les activités de la LDH et de l'AChE.....	61
2. Marqueurs du stress oxydant dans la fraction cytosolique du cerveau	62
2.1. La peroxydation lipidique.....	62
2.2. L'activité enzymatique de la CAT et de la SOD.....	62
2.3. L'activité enzymatique de système glutathion.....	63
3. Les marqueurs du stress oxydatif dans la fraction mitochondriale du cerveau.....	63
4. La capacité antioxydante totale.....	66
5. L'examen histopathologique.....	66
III. Discussion.....	69
III.1. Discussion de l'étude expérimentale <i>in vitro</i>	69
III.2. Discussion de l'étude expérimentale <i>in vivo</i>	74
Conclusion.....	80
Références bibliographiques.....	82
Résumés	
Annexes	
Publication	

Liste des abréviations

- ❖ **ABTS:** 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid).
- ❖ **ACh:** Acétylcholine.
- ❖ **AChE:** Acétylcholinestérase.
- ❖ **AGPI:** Acides gras polyinsaturés.
- ❖ **AMPc :** Adénosine monophosphate cyclique.
- ❖ **AP-1 :** Activator protein-1.
- ❖ **ARN:** Acide Ribonucléique
- ❖ **ATCI :** Acétylthiocholine-iodide.
- ❖ **BECM:** *n* -BuOH extract of *Centaurea maroccana*.
- ❖ **BHA:** Butylated hydroxyanisole.
- ❖ **BHT:** Butylated hydroxytoluene.
- ❖ **C6 :** *Rattus norvegicus* brain glioma.
- ❖ **CAT:** Catalase.
- ❖ **CDDP :** Cis-Dichloro Diammine Platinum (II)
- ❖ **COX :** Cyclo-oxygénase.
- ❖ **CP :** Cisplatine.
- ❖ **CUPRAC:** Cupric Reducing Antioxidant Capacity.
- ❖ **DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium.
- ❖ **DMSO:** Dimethylsulfoxide.
- ❖ **DPPH° :** 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle
- ❖ **DTNB:** 5, 5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid).
- ❖ **EDTA :** Ethylene Diamine Tetraacetic.
- ❖ **FBS :** Fetal Bovine Serum.
- ❖ **GMPc :** Guanosine monophosphate cyclique.
- ❖ **GPx:** Glutathion peroxydases.
- ❖ **GRD:** Ganglion des racines dorsales.
- ❖ **GSH :** Glutathion Réduit.
- ❖ **GSSG:** Glutathion oxydé.
- ❖ **GST:** Glutathionne-S-Transférase.
- ❖ **HCl :** Acide chlorhydrique.
- ❖ **HOCl :** L'acide hypochloreux.
- ❖ **HT29 :** *Homo sapiens* colorectal adenocarcinoma.

- ❖ **IL-6**: Interleukine 6.
- ❖ **Ip** : Intra-péritonéale.
- ❖ **KCl** : Chlorure de potassium.
- ❖ **LC-MS**: Liquid-chromatography mass spectrometry.
- ❖ **LDH**: lactate dehydrogenase.
- ❖ **LOD** : Limite de détection.
- ❖ **LOO^{••}**: Peroxyde lipidique.
- ❖ **LOQ** : Limite de Quantification.
- ❖ **LPO**: Lipid peroxidation.
- ❖ **MDA**: Malondialdéhyde.
- ❖ **MPO** : Myéloperoxydase.
- ❖ **NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit.
- ❖ **NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit.
- ❖ **NBT**: Nitro Blue tetrazolium.
- ❖ **NF-κB**: Nuclear factor-kappa B.
- ❖ **ONOO[•]** : Peroxynitrite.
- ❖ **PAS** : Sites anioniques périphériques.
- ❖ **Ppb** : Parts per billion.
- ❖ **SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate.
- ❖ **SNA**: système nerveux autonome.
- ❖ **SNC**: système nerveux central.
- ❖ **SNP** : sodium nitroprusside.
- ❖ **SNP**: système nerveux périphérique.
- ❖ **SNS**: Système Nerveux Somatique.
- ❖ **SOD**: Superoxyde Dismutase.
- ❖ **SRB** : Sulforhodamine B.
- ❖ **TAC**: Total antioxidant capacity.
- ❖ **TBA**: Thiobarbiturique acid.
- ❖ **TCA**: Tricholor-Acetic-Acid.
- ❖ **TNB**: Thionitrobenzoïque.
- ❖ **TNF-α**: Tumor necrosis factor-α.
- ❖ **TRX**: Thiorédoxines.
- ❖ **TRXR**: Thiorédoxine réductase.
- ❖ **8-OH-G**: 8-Hydroxy-guanine.

Liste des figures

Figure 1 : La structure chimique du cisplatine	4
Figure 2 : Le transport / export et les cibles du cisplatine	5
Figure 3 : Activation du cisplatine et induction des dommages de l'ADN	6
Figure 4 : Les mécanismes d'action du cisplatine dans le traitement du cancer	7
Figure 5 : Système nerveux central.....	8
Figure 6 : Structure de la moelle épinière	9
Figure 7 : Neurone et disposition laminaire du cortex	10
Figure 8 : Schéma représentant les ganglions des racines dorsales.....	11
Figure 9 : L'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	16
Figure 10 : Sources cellulaires de production des ROS	19
Figure 11 : Le transport d'électrons à travers la chaîne respiratoire et la production des ROS.....	19
Figure 12 : Les possibles effets du stress oxydatif.....	20
Figure 13 : Processus général de la peroxydation lipidique	21
Figure 14 : La réaction de la base guanine avec le radical hydroxyle.....	21
Figure 15 : Activité de balayage radicalaire des SOD, CAT et GPx	24
Figure 16 : Systèmes antioxydants enzymatiques	24
Figure 17 : Représentation schématique du site du système de défense antioxydant (enzymatique et non enzymatique) au niveau cellulaire.....	27
Figure 18 : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe.....	28
Figure 19 : Structures chimiques des polyphénols courants.....	30
Figure 20 : Les propriétés biologiques des polyphénols alimentaires sont importantes dans la prévention des maladies liées au mode de vie.....	31
Figure 21 : Photographies du genre <i>Centaurea</i> , avec un accent particulier sur le sous-genre <i>Centaurea</i> et la secte.....	33
Figure 22 : Classification botanique de l'espèce <i>Centaurea maroccana</i>	34
Figure 23 : Protocole d'extraction de la plante <i>Centaurea maroccana</i>	38
Figure 24 : Les différentes étapes du Protocole expérimental.....	47
Figure 25 : Principe de dosage du Malondialdéhyde.....	48
Figure 26 : Principe du dosage de glutathion.....	49
Figure 27 : Le profile LC-MS de l'extrait <i>n-BuOH</i> de <i>C. maroccana</i>	53

Figure 28: Chromatogramme des standards.....	53
Figure 29: L'activité antioxydante de l'extrait <i>n-BuOH</i> <i>C. maroccana</i> à l'égard du radical DPPH'.....	55
Figure 30: L'effet scavenger d'ABTS ⁺ de l'extrait <i>n-BuOH</i> de <i>Centaurea maroccana</i> et les standards BHT, BHA.....	56
Figure 31: Histogramme représentant le pouvoir inhibiteur de l'extrait butanolique de <i>C. maroccana</i> (CUPRAC).....	56
Figure 32: Histogramme représentant l'activité antioxydante de <i>C. maroccana</i> sur la β -carotène/acide linoléique.....	57
Figure 33: Histogramme représentant le pouvoir inhibiteur de l'extrait butanolique du <i>C. maroccana</i> (DMSO).....	58
Figure 34: Pouvoir réducteur de l'extrait <i>n-BuOH</i> de <i>C.maroccana</i> et les standards BHT, BHA, acide ascorbique.....	58
Figure 35: L'inhibition de la peroxydation lipidique (%) du BECM et du trolox.....	59
Figure 36: Activité inhibitrice de l'AChE (%) de BECM et le contrôle positif chlorhydrate de donépézil.....	60
Figure 37: Cytotoxicité de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C. maroccana</i> sur des lignées cellulaires C6 et HT29.....	61
Figure 38: L'effet de BECM (200 mg / kg) sur les niveaux d'AChE et LDH dans le cerveau chez les souris traités par le CP (8mg/kg).....	62
Figure 39: L'effet protecteur de BECM (200 mg/kg) sur les marqueurs de stress oxydatif de la fraction cytosolique du cerveau chez des souris traités par le CP (8mg/kg).....	64
Figure 40: L'effet protecteur de BECM (200 mg/kg) sur les marqueurs de stress oxydatif de la fraction mitochondriale du cerveau chez des souris traitées par le CP (8 mg/kg).....	65
Figure 41: L'effet du BECM (200 mg/kg) sur la capacité antioxydante totale (TAC).....	66
Figure 42: Photomicrographie de l'analyse histopathologique des tissus cérébraux des souris.....	67
Figure 43: Score du dommage histologique.....	68

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques distinctives des neurotransmetteurs du SNA.....	12
Tableau 2 : Les agents chimiothérapeutiques causant une neuropathie périphérique	14
Tableau 3 : Résumé des espèces réactives d'oxygène (ROS) et d'azote (RNS)	15
Tableau 4 : les relations entre les maladies et le stress oxydant.....	22
Tableau 5 : Les sous-classes des flavonoïdes et leurs sources alimentaires.....	29
Tableau 6 : Teneur en polyphénols totaux et des flavonoïdes d'extrait <i>n-BuOH</i> de <i>Centaurea maroccana</i>	52
Tableau 7 : Le profile LC-MS des composés phénoliques de l'extrait <i>n-BuOH</i> de <i>C. maroccana</i>	54

Introduction

Introduction

Le cisplatine (CP) est l'un des agents chimiothérapeutiques à base de platine, largement utilisé pour le traitement de diverses tumeurs malignes, à savoir le cancer du testicule, les tumeurs ovariennes métastatiques, le cancer du poumon, le cancer de la vessie avancé ([Wassem et Parvez, 2013](#)). Son utilisation est souvent limitée en raison de ses effets secondaires néfastes comme la néphrotoxicité et la neurotoxicité étant les plus sévères ([Karavelioglu et al., 2015](#)).

Bien que le mécanisme de la neurotoxicité induite par le CP demeure encore inconnu cependant plusieurs études ont indiqué que les dommages de l'ADN, l'inflammation, le dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydatif et l'apoptose dans le système nerveux représentent les mécanismes les plus importants de la neurotoxicité induite par le CP ([Almutairi et al., 2017](#)).

D'autre part, l'un des mécanismes les plus importants qui provoque la neurotoxicité par le cisplatine est la génération des ROS ([Chtourou et al., 2015](#)), dans lequel de nombreuses études ont indiqué que le CP est lié directement à l'ADN neuronal et provoque le stress oxydatif dans le système nerveux ([Almutairi et al., 2017](#)).

On outre, le dysfonctionnement mitochondrial induit par le cisplatine conduit à l'augmentation du stress oxydatif ([Owoeye et Onwuka, 2015](#)), où l'association directe entre le dysfonctionnement mitochondrial et la toxicité des agents chimiothérapeutiques a été démontré par ([Szewczyk et Wojtczak, 2002](#)).

Par ailleurs, les données obtenues dans une étude antérieure sur des souris mâles CD-1 nude, ont indiqué que le traitement par le cisplatine sous l'effet d'une dose de (10 mg/kg), provoque une baisse des taux plasmatiques d'antioxydants ([Pace et al., 2003](#)).

Afin de réduire et de prévenir la neurotoxicité causée par le CP, divers traitements (antioxydants) ont été utilisés pour le développement d'interventions protectrices et thérapeutiques efficaces ([Gulec et al., 2013](#)) tels que les agents chimioprotecteurs on cite l'asérythropoïétine ([Orhan et al., 2004](#)), le valproate ([Rodriguez-Menendez et al., 2008](#)), la vitamine E et la vitamine C ([Ajith, 2009](#)), la mélatonine ([Tuncer et al., 2010](#)), du sélénium ([Karavelioglu et al., 2015](#)), de la méthionine ([Hinduja et al., 2015](#)).

L'administration des produits naturels tels que les extraits des plantes médicinales est l'une des approches efficaces pour réduire les effets secondaires induits par les médicaments anticancéreux en raison du leur bon profil préventif et de leur tolérance par l'homme ([Heidari-Soreshjani et al., 2017](#)).

Plusieurs études récentes ont rapporté que un grand nombre de produits naturels ont été utilisés comme agents chimioprotecteurs en termes de leurs effets synergiques à l'égard de la neurotoxicité induite par le cisplatine, à titre d'exemple, l'hespéridine (Kamisli *et al.*, 2015), la curcumine (Al Moundhri *et al.*, 2013), le resvératrol (Akman *et al.*, 2015), et l'huile de poisson (Kamisli *et al.*, 2014).

Le genre *Centaurea* comprend plus de 700 espèces dont 45 poussent spontanément en Algérie, notamment 7 au Sahara (Quezel et Santa, 1963). La plante *Centaurea* est utilisée en médecine traditionnelle depuis des décennies (Yesilada *et al.*, 1995) en raison des activités biologiques importantes qui caractérisent ce genre telles que l'activité antibactérienne, antifongique (Zater *et al.*, 2016), antioxydante (Aliouche *et al.*, 2019), anti-inflammatoire (Zaouani *et al.*, 2017) et cytotoxique (Escher *et al.*, 2018).

De plus, les espèces de genre *Centaurea* sont une source précieuse de métabolites secondaires bioactifs, en particulier les flavonoïdes et lactone sesquiterpène, leur présence a été signalée par plusieurs études phytochimiques (Seghiri *et al.*, 2009; Grienke *et al.*, 2018). Cependant, à notre connaissance, aucune étude antérieure n'a évalué l'effet neuroprotecteur de *Centaurea maroccana* l'espèce endémique du nord du Sahara algérien.

C'est dans cette optique, que s'inscrit l'objectif de la présente étude qui consiste à évaluer l'effet protecteur de l'extrait butanolique de la plante *Centaurea maroccana* sur la neurotoxicité induite par le cisplatine chez les souris, et de clarifier son rôle dans la prévention du stress oxydatif mitochondrial en réponse à l'exposition au CP. Dans ce cadre deux études expérimentales ont été réalisés parallèlement :

- ✓ Etude *in vitro* : vise à évaluer l'activité antioxydante, antiproliférative et l'activité neuroprotectrice de l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea maroccana* ainsi qu'une étude phytochimique.
- ✓ Etude *in vivo* : avait pour but d'évaluer l'effet neuroprotecteur du même extrait sur la neurotoxicité induite par le CP.

Première partie: Synthèse bibliographique

- ❖ *Le Cisplatine*
- ❖ *Le Système nerveux*
- ❖ *La neurotoxicité*
- ❖ *Le stress oxydatif et système antioxydant*
- ❖ *Les Polyphénols et aperçu bibliographique sur le genre Centaurea.*

I. Le cisplatine

Le cisplatine également appelé cis-diaminedichloroplatine (II) (CDDP), est un composé de coordination métallique (platine). Il s'agit d'une poudre cristalline blanche ou jaune foncé à jaune orange à la température ambiante (Dasari et Tchounwou, 2014).

Le cisplatine est l'un des médicaments de chimiothérapie les plus puissants, largement utilisé pour le traitement du cancer (Florea et Büsselberg, 2011).

1. La chimie du cisplatine

Le cisplatine est un complexe de métal lourd contenant un atome central de platine entouré de deux atomes de chlorure et de deux groupements ammoniacque (Mehmood *et al.*, 2014). Il s'agit d'un complexe plan carré où les ligands occupent des positions cis. C'est-à-dire que les deux ligands chlore sont d'un côté et les deux ligands amine sont de l'autre (figure 1) (Rajapakse et Dunuweera, 2017).

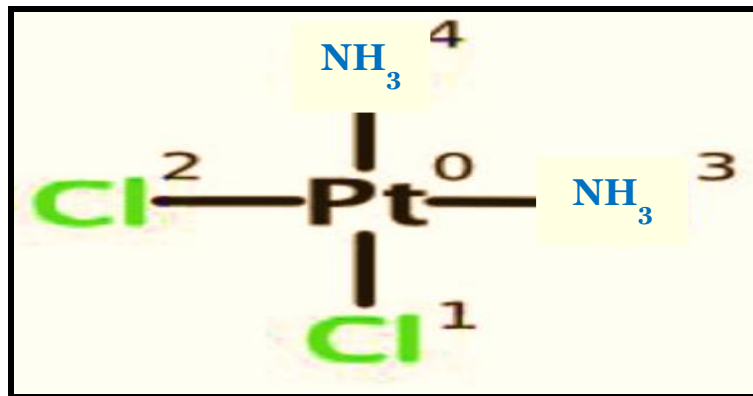


Figure1 : La structure chimique du cisplatine (Mehmood *et al.*, 2014).

2. Pharmacocinétique du Cisplatine

Le cisplatine réagit facilement avec les groupements thiols des protéines présentes dans le sang, il est disponible sous deux formes, la forme libre et la forme lié aux protéines du sang (Rajapakse et Dunuweera, 2017). Cependant la majorité de cisplatine présente dans la cellule n'est pas liée aux protéines et localisée sur le cytosol (Barabas *et al.*, 2008).

➤ Absorption, distribution et élimination

- ✓ Après une perfusion intraveineuse, le cisplatine diffuse rapidement dans les tissus et se lie fortement aux protéines plasmatiques (O'Dwyer *et al.*, 2000).
- ✓ Le cisplatine libre pénètre dans la cellule par diffusion ou par transport actif via des récepteurs spécifiques (figure 2), il utilise les protéines qui transportent le cuivre pour atteindre les compartiments intracellulaires (Gómez-Ruiz *et al.*, 2012).

- ✓ Plusieurs étapes de la voie métabolique par laquelle le cisplatine est devenu bioactif pour une neurotoxicité, ont récemment été identifiées (Zhang *et al.*, 2006). L'enzyme membranaire gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), joue un rôle dans le métabolisme du cisplatine, car cette enzyme clive le conjugué cisplatine-glutathion en un métabolite toxique (Peres et Dantas da Cunha, 2013).
- ✓ la disparition du platine ultra filtrable, rapide et se produit de manière bi-phasique.
- ✓ L'élimination du cisplatine est essentiellement par voie rénale (O'Dwyer *et al.*, 2000).

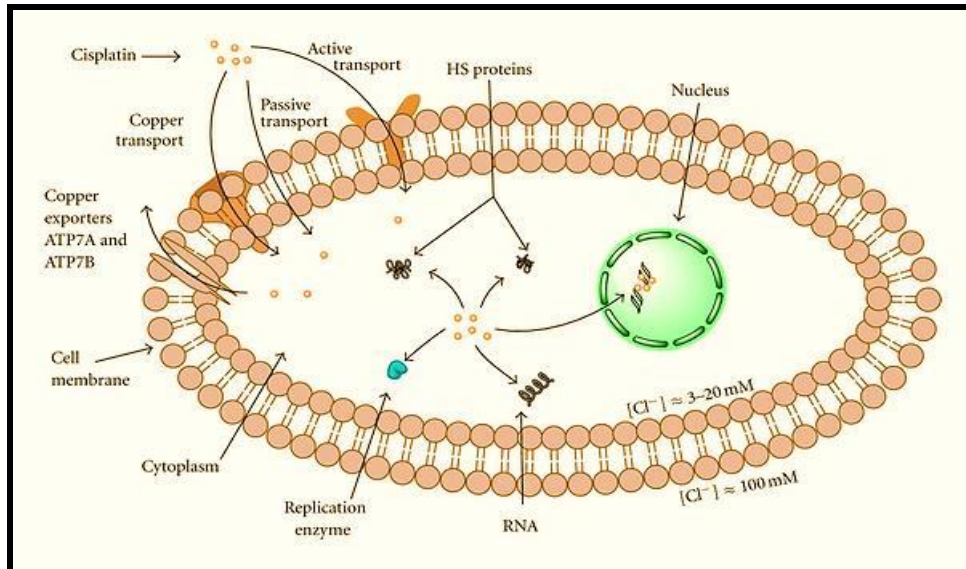


Figure 2: Le transport / export et les cibles du cisplatine (Gómez-Ruiz *et al.*, 2012).

3. Pharmacodynamique du cisplatine

Le cisplatine est activé par une hydratation impliquant un échange des deux atomes de chlore périphérique par l'eau ou des hydroxyles. En présence de fortes concentrations de chlore, dans un milieu isotonique ou dans le milieu extracellulaire, l'hydratation n'aura pas lieu et le médicament restera neutre. Généralement le premier effet exercé par le cisplatine sur la cellule cancéreuse consiste l'inhibition de la synthèse de l'ADN, les quantités nécessaires pour cela sont inférieures à celles nécessaires pour inhiber la synthèse de l'ARN et les protéines (Barabas *et al.*, 2008).

Les dégâts causés par le cisplatine sont similaires à ceux provoqués par les agents alkylants, les deux atomes de chlore sont remplacés par l'eau puis ils se lient aux deux sites sur l'ADN. L'interaction entre le cisplatine et l'ADN peut contribuer à la formation des superoxydes causant ainsi, des dégâts supplémentaires aux cellules cancéreuses (Reed *et al.*, 2006).

4. Les principaux mécanismes d'action du cisplatine

Dans des conditions de faible concentration en chlorure, comme dans le cytosol, le cisplatine subit un processus appelé aquation, dans lequel un ou deux atomes de chlorures sont remplacés par des molécules d'eau (figure 3). Au cours du processus d'aquation, le cisplatine devient très réactif et se lie facilement à diverses biomolécules à l'intérieur de la cellule (Kartalou et Essigmann, 2001).

5.1. L'interaction avec l'ADN

Le mécanisme d'action du cisplatine est médié par l'interaction avec l'ADN afin de produire des adduits, alors que le principe d'action consiste à exercer sa cytotoxicité sur les cellules cancéreuses, notamment par des liaisons de réticulation de cisplatine mono-, inter et intra-strand (Singh *et al.*, 2018). Le cisplatine réagit particulièrement avec les sites N7 nucléophiles des bases de la purine, et une double réaction peut lier de manière covalente des purines (Rocha *et al.*, 2018).

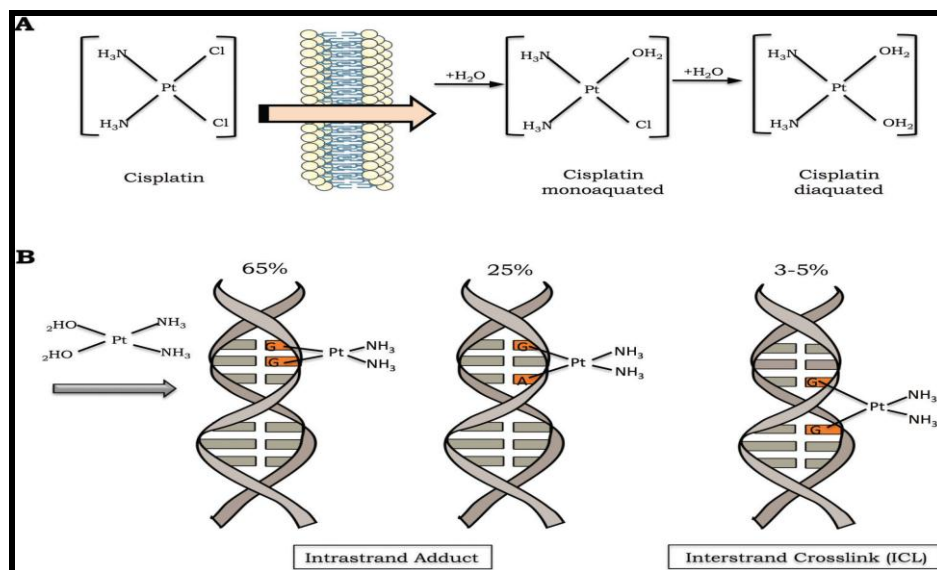


Figure 3: Activation du cisplatine et induction des dommages de l'ADN (Rocha *et al.*, 2018).

5.2. L'apoptose

Les principaux adduits à l'ADN (les adduits intrastrands et réticulants) sont responsables de l'activation de l'apoptose (Siddik, 2003).

L'apoptose implique diverses voies qui convergent vers une seule phase irréversible dans laquelle les nucléases et les protéases digèrent la cellule condamnée. Des études antérieures sur l'apoptose ont mis en évidence de nombreux facteurs au sein de la cellule qui déterminent la survie de cette dernière. Ces facteurs sont la famille des protéines Bcl-2, le suppresseur de tumeur p53 et les voies de transduction du signal intracellulaire (Aldossary, 2019).

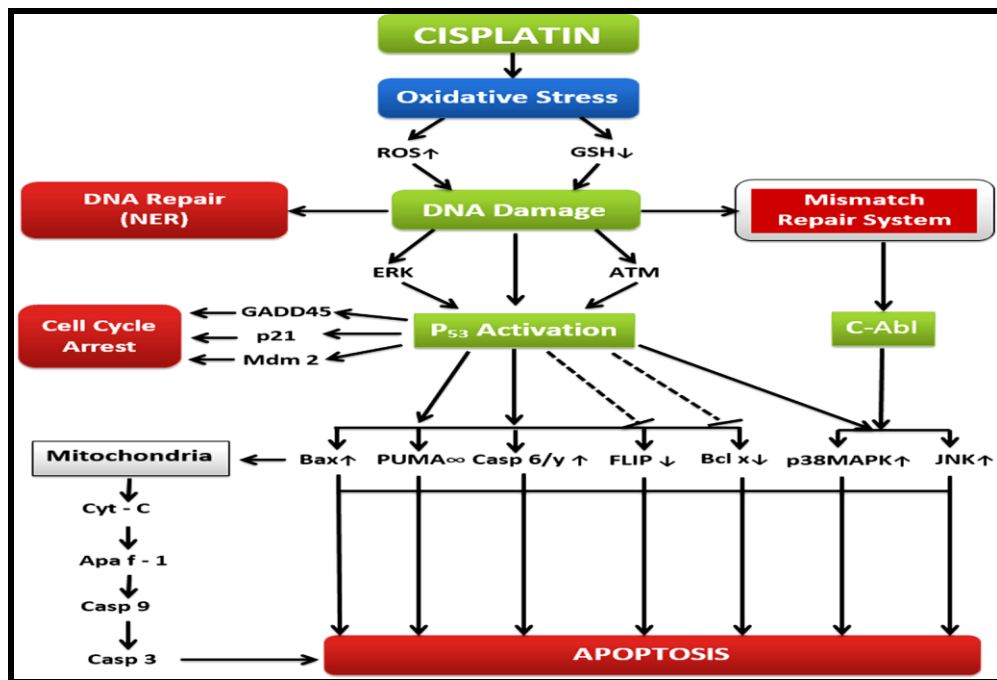


Figure 4: Les mécanismes d'action du cisplatine dans le traitement du cancer (Dasari et Tchounwou, 2014).

5.3. Le cisplatine et les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

A côté des dommages de l'ADN, le cisplatine induit également la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui déclenchent la mort cellulaire. Ils induisent une peroxydation lipidique, un épuisement des groupes sulfhydriles, une modification des voies de transduction du signal, une homéostasie du calcium et des dommages à l'ADN (Florea et Büsselberg, 2011). Aussi, les ROS peuvent induire l'apoptose par les voies habituelles extrinsèques et intrinsèques (Dasari et Tchounwou, 2014).

5.4. Le cisplatine et le dysfonctionnement mitochondrial

Les mitochondries sont des organites vitaux dans les cellules, responsables de la production d'énergie, elles jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire et la signalisation de l'apoptose (Zhan et al., 2013). Le cisplatine s'accumule rapidement dans les mitochondries peu de temps après son administration, où il a stimulé la génération des ROS qui à leur tour ont causé des dommages mitochondriaux, altérant la fonction métabolique et en induisant d'autres effets cytotoxiques (Choi et al., 2015).

II. Le système nerveux

Le système nerveux est le moyen de communication et de sensation anatomiquement, le système nerveux humain se divise en deux parties principales: le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP).

- ✓ *Le système nerveux central*, comprend l'encéphale et la moelle épinière.
- ✓ *Le système nerveux périphérique* se divise en deux grandes parties, une partie somatique (SNS) qui contrôle les mouvements corporels et innervent des organes sensoriels ainsi une partie autonome (SNA) qui innervent des organes viscéraux (Webb, 2017).

1. Le système nerveux central (SNC)

1.1. L'organisation macroscopique

1.1.1. L'encéphale

L'encéphale est une partie spongieuse faite de tissus nerveux et de tissus de soutien. Il est situé dans la boîte crânienne et est protégé par 3 couches. La partie inférieure de l'encéphale, soit la base, est liée à la moelle épinière. L'ensemble, l'encéphale et la moelle épinière forment le SNC. L'encéphale est composé du **cerveau**, du **cervelet** et du **tronc cérébral** (Widmaier *et al.*, 2015).

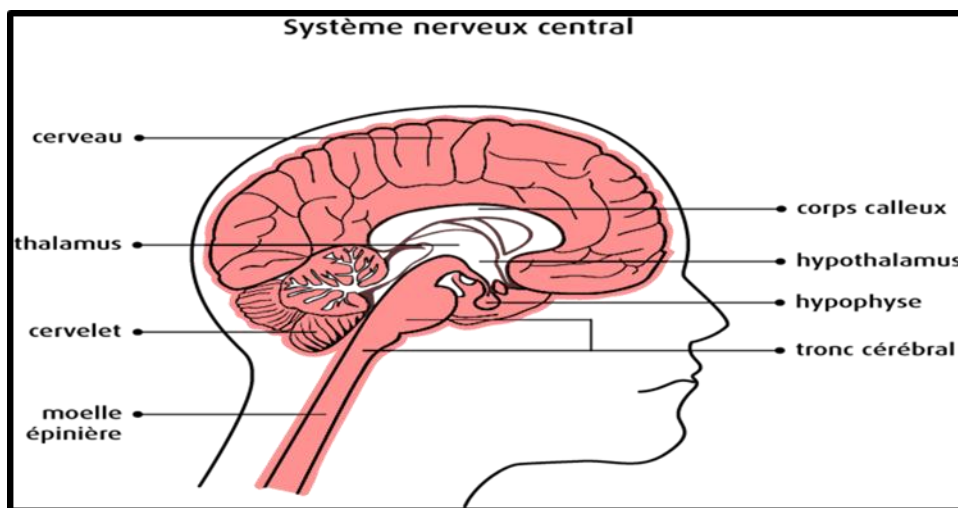


Figure 5: Système nerveux central (Widmaier *et al.*, 2015).

1.1.1.1. Le cerveau

Le cerveau est issu du point de vue embryonnaire du feuillet externe appelé ectoderme. Il forme la partie la plus volumineuse de l'encéphale et est impliqué dans le traitement des informations sensorielles et motrices somatiques ainsi que dans toutes les pensées et les fonctions intellectuelles conscientes (Marieb et Hoehn, 2012).

1.1.1.2. Le cervelet

Le cervelet représente environ un dixième du cerveau en taille et en poids, et est situé dans la fosse crânienne postérieure (Roostaei *et al.*, 2014). Le cervelet joue un rôle central dans la coordination motrice réflexive et planifiée aux processus émotionnels et cognitifs (Witter et De Zeeuw, 2015).

1.1.1.3. Le tronc cérébral:

On appelle collectivement tronc cérébral l'ensemble formé par le bulbe rachidien, le pont et le mésencéphale. Il est impliqué dans une multitude de fonctions parmi lesquelles, le contrôle du rythme cardiaque, de la pression artérielle et de la respiration (Crossman et Neavy, 2004).

1.1.2. La moelle épinière

La moelle épinière est située dans le canal rachidien mais ne s'étend pas sur toute la longueur du canal vertébral. Elle contrôle les muscles volontaires du tronc et les muscles supérieurs et inférieurs de l'extrémité (Bican *et al.*, 2013). La moelle épinière sert de conduit d'information voyageant entre le cerveau et la périphérie (Cho, 2015).

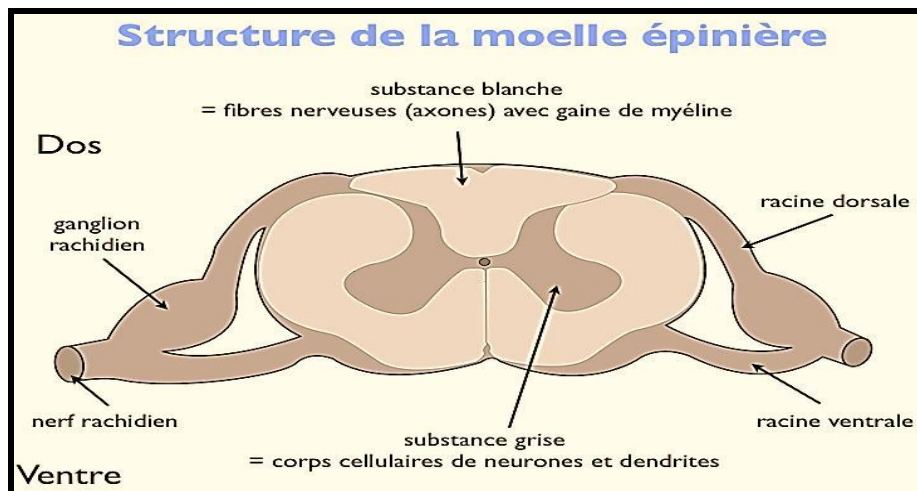


Figure 6: Structure de la moelle épinière (Sherwood, 2006).

1.2. Organisation microscopique

• Le tissu nerveux

Le système nerveux est composé de deux types des cellules: les neurones et les cellules gliales (Schmidt et Baier Leach, 2003).

1.2.1. Le neurone

Le neurone est la cellule informative du système nerveux. Il est fait d'un corps cellulaire (noyau, cytoplasme et organites) et de prolongements. Sa structure varie selon sa

fonction, mais la caractéristique anatomique commune est dans les prolongements du corps cellulaire, dendrites et axones. Elles ont pour fonction de recevoir, générer et transmettre des signaux nerveux et elles assurent les différentes fonctions cérébrales ([Amiel-Tison et Gosselin, 2010](#)).

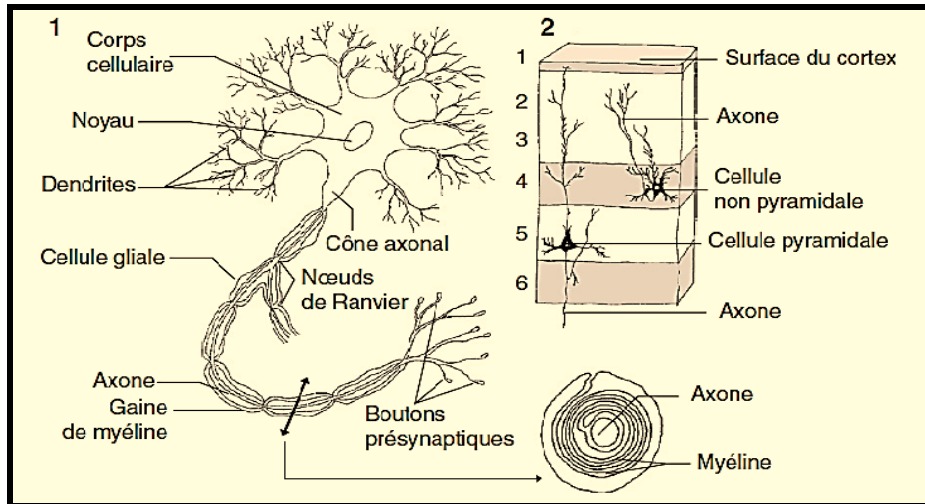


Figure 7: Neurone et disposition laminaire du cortex ([Amiel-Tison et Gosselin, 2010](#)).

1.2.2. Les cellules gliales

Les cellules gliales constituent une grande partie du tissu nerveux. Elles occupent environ la moitié du volume du cerveau. Elles jouent également un rôle majeur dans la résistance du système nerveux aux maladies et aux traumatismes ([Jessen, 2004](#)). Il existe de nombreux types des cellules gliales, dont certains sont spécifiques au SNC, tandis que d'autres se rencontrent uniquement dans le SNP ([Rasband, 2015](#)).

2. Le système nerveux périphérique

Le système nerveux périphérique est la partie du système nerveux qui comprend les nerfs et les ganglions qui se trouvent entre le cerveau et la moelle épinière ([Rea, 2015](#)).

Le système nerveux périphérique comprend :

2.1. Système nerveux somatique

La partie du système nerveux périphérique associée au contrôle volontaire des mouvements du corps via l'action des muscles squelettiques ([Fix, 2012](#)).

2.2. Système nerveux autonome

La partie du système nerveux responsable des fonctions non soumises au contrôle volontaire. Leur prolongement comprend l'ensemble des nerfs et de leurs renflements (ganglions nerveux) ([Hervé, 2009](#)).

✓ **Les nerfs crâniens**

Le corps humain a 12 paires de nerfs crâniens qui contrôlent les fonctions motrices et sensorielles de la tête et du cou (**Romano et al., 2019**).

✓ **Les nerfs rachidiens**

Les nerfs rachidiens (ou les nerfs spinaux) sont aux nombres de 31 paires, ils naissent à la moelle épinière, et contrôlent le reste du corps. Ils sont constitués d'une racine antérieure (motrice) et d'une racine postérieure (sensitive) (**Rang et al., 2003**).

✓ **Les ganglions des racines dorsales**

Les ganglions de la racine dorsale (GRD) sont situés dans le système nerveux périphérique (SNP), entre la corne dorsale de la moelle épinière et les extrémités nerveuses périphériques, et contiennent divers types de cellules telles que les cellules gliales satellites, les cellules endothéliales, les macrophages et les neurones sensoriels primaires (**Berta et al., 2017**).

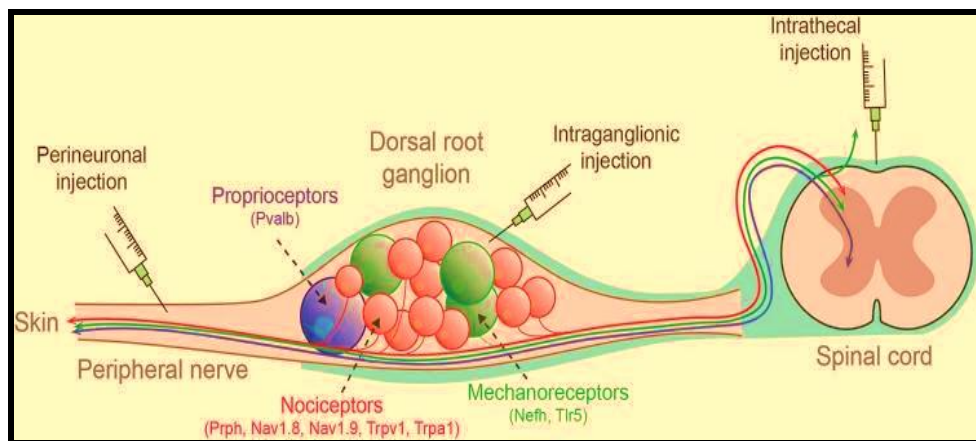


Figure 8: Schéma représentant les ganglions des racines dorsales (**Berta et al., 2017**).

3. Synapses et neurotransmetteurs

✓ **Les synapses**

Une synapse est une jonction anatomique spécialisée entre deux neurones, dans laquelle l'activité électrique d'un neurone pré-synaptique influence l'activité électrique d'un neurone post-synaptique. Sur le plan structural et fonctionnel, on distingue les synapses électriques et les synapses chimiques (**Tortora et Derrickson, 2006**).

✓ **Les neurotransmetteurs**

Les impulsions chimiques libérés par les neurones, appelés neurotransmetteurs, permettent aux fibres nerveuses de communiquer des signaux aux autres nerfs voisins (**Forati**

et al., 2015). Les deux neurotransmetteurs les plus courants libérés par les neurones du système nerveux autonome (SNA) sont l'acétylcholine et la noradrénaline (McCorry, 2007).

Tableau 1 : Caractéristiques distinctives des neurotransmetteurs du SNA (McCorry, 2007).

Caractéristique	Acétylcholine	Norépinephrine	Epinéphrine
Site de sortie	Tous les neurones pré ganglionnaires du SNA; tous les neurones post ganglionnaires du système parasympathique; certains post ganglionnaires sympathiques des neurones aux glandes sudoripares.	Le plus sympathique neurones postganglionnaires; médullosurrénale (20% de la sécrétion).	Médullosurrénale (80% de la sécrétion)
Récepteur	Nicotinique, muscarinique (cholinergique).	$\alpha 1, \alpha 2, \beta 1$ (adrénergique).	$\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2$ (adrénergique).
Résiliation d'activité	Dégradation enzymatique par Cholinestérase.	Reprise dans les terminaisons nerveuses; diffusion en fente synaptique, transformation métabolique par monoamine oxydase ou catéchol-o-méthyl-transférase dans le foie.	Transformation métabolique par catéchol-o-méthyl-transférase dans le foie.

III. La neurotoxicité

La neurotoxicité est définie comme tout effet indésirable sur la structure ou la fonction des systèmes nerveux central et périphérique, résultant d'une diversité d'agents biologiques, chimiques ou physiques (Soleimani *et al.*, 2016). Certains agissent directement sur les cellules nerveuses, d'autres interfèrent avec les processus métaboliques, certains perturbent la fonction neuronale, alors que d'autres induisent le mauvais développement ou des dommages du système nerveux de l'adulte (Spencer *et Lein*, 2014). Les principaux mécanismes de la neurotoxicité sont la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) entraînant un stress oxydatif, la libération de cytokines provoquant une neuro-inflammation et des dérèglements de l'apoptose conduisant à la mort neuronale (Teleanu *et al.*, 2019).

1. La neurotoxicité médicamenteuse

La chimiothérapie, la radiothérapie et les drogues à usage récréatif peuvent conduire à une neurotoxicité potentielle (Sharma *et al.*, 2014). En outre, de nombreux facteurs du métabolisme du médicament peuvent augmenter la susceptibilité à la neurotoxicité, tels que l'état nutritionnel d'un individu, le débit sanguin local et l'absorption tissulaire, l'état de la barrière hémato-encéphalique, le taux d'absorption du médicament, la voie d'administration du médicament aux tissus cibles, activation et élimination du médicament et de ses métabolites (Grill *et Maganti*, 2011).

2. Les médicaments de la chimiothérapie

La chimiothérapie est un moyen de lutte important contre de nombreux cancers. Cependant, le but de la chimiothérapie c'est irradié les cellules cancéreuses, mais elle endommage également les cellules saines, qui va entraîner des effets secondaires (Pearce *et al.*, 2017).

La neurotoxicité est une complication fréquente et souvent limitant les traitements de la chimiothérapie (James *et al.*, 2008). Les agents chimio thérapeutiques utilisés fréquemment qui sont associés à la neurotoxicité comprennent les composés de platine, les taxanes et les vinca-alcaloïdes (tableau 2) (Beijers *et al.*, 2012).

Tableau 2: Les agents de la chimiothérapie causant une neuropathie périphérique (Beijers *et al.*, 2012).

Les agents chimiothérapeutiques	
Sel de platine	Cisplatine, Oxaliplatine, Carboplatine
Les taxanes	Paclitaxel, Docétaxel
Alcaloïdes de la pervenche	Vincristine, Vinblastine, Vinorelbine

2.1. Le mécanisme de la neurotoxicité des agents chimiothérapeutiques:

Le mécanisme pathogène par lequel les agents chimiothérapeutiques endommagent les structures du système nerveux et causent la neuropathie périphérique est multifactoriel, et implique une perturbation des microtubules, un stress oxydatif et dommages à la gaine myélinique, dommages d'ADN, processus immunologique d'inflammation (Zajaczkowska *et al.*, 2019), les changements morphologiques des noyaux des neurones des ganglions rachidiens de la racine dorsale; qui va conduire à l'altération du fonctionnement des mitochondries dans les axones, accumulation intra-axonale du sodium et du calcium avec une perturbation des canaux ioniques dépendant (LaPointe *et al.*, 2013).

3. La neurotoxicité du cisplatine

La neurotoxicité par le cisplatine occupe la troisième place, cependant les parties les plus touchées du système nerveux sont les nerfs sensoriels périphériques. La neuropathie systématique, les convulsions et l'encéphalopathie constituent la neuropathie périphérique chez les patients traités par le cisplatine (Aldossary, 2019).

L'accumulation du cisplatine dans les neurones du ganglion de la racine dorsale (GRD) sous la forme d'adduits de platine-ADN serait l'un des principaux mécanismes de la neurotoxicité (Zhu *et al.*, 2016).

En outre, plusieurs autres mécanismes contribuant à la neurotoxicité induite par le cisplatine ont été suggérés, notamment la détérioration des neurones sensoriels périphériques, des modifications des cascades de signalisation cellulaire, des modifications de l'homéostasie et de la signalisation calciques, du stress oxydatif, du dysfonctionnement mitochondrial et de l'induction de l'apoptose à la suite de la platination de l'ADN (Starobova *et Vetter*, 2017).

IV. Le stress oxydatif et système antioxydant

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts graves (Kumar Keshari *et al.*, 2015).

1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont les produits du métabolisme cellulaire normal, un radical libre est défini comme un atome ou une molécule contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans une coquille de valence ou une orbite externe, et est capable d'une existence indépendante. Les ROS peuvent être classés en deux groupes des composés, à savoir, radicalaires et non radicalaires (tableau 3). Les radicaux libres les plus importants qui sont produits lors des réactions métaboliques sont l'anion superoxyde et le radicale hydroxyle (Phaniendra *et al.*, 2014).

Tableau 3: Résumé des espèces réactives d'oxygène (ROS) (Sharma, 2014).

Les espèces réactives d'oxygène		Les espèces réactives d'azote	
Radicalaires	Non radicalaires	Radicalaires	Non radicalaires
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$)	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	L'oxyde nitrique (NO^{\cdot})	Peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$)
Le radical hydroxyle (OH^{\cdot})	L'acide hypochloreux ($HOCl$)	Dioxyde nitrique (NO_2^{\cdot})	Nitrites (NO_2^-)
le radical peroxyde (ROO^{\cdot})	Ozone (O_3)		Nitrates (NO_3^-)
Le radical alcoyle (RO^{\cdot})	L'oxygène singlet (1O_2)		Nitrosyle (NO^+)

Plus important encore, l'excès des ROS peut endommager les lipides cellulaires, les protéines et l'ADN, ce qui entraîne une augmentation du stress oxydatif dans diverses maladies, inhibant ainsi les voies de transduction du signal et les fonctions cellulaires normales (Handa *et al.*, 2016).

1.1. Les différents types des radicaux libres oxygénés (ROS)

Tous les dérivés d'oxygène hautement réactifs peuvent être qualifiés d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ce groupe comprend les espèces radicalaires et les non radicalaires qui sont des agents oxydants ou sont facilement convertis en radicaux libres (Russell et Cotter, 2015).

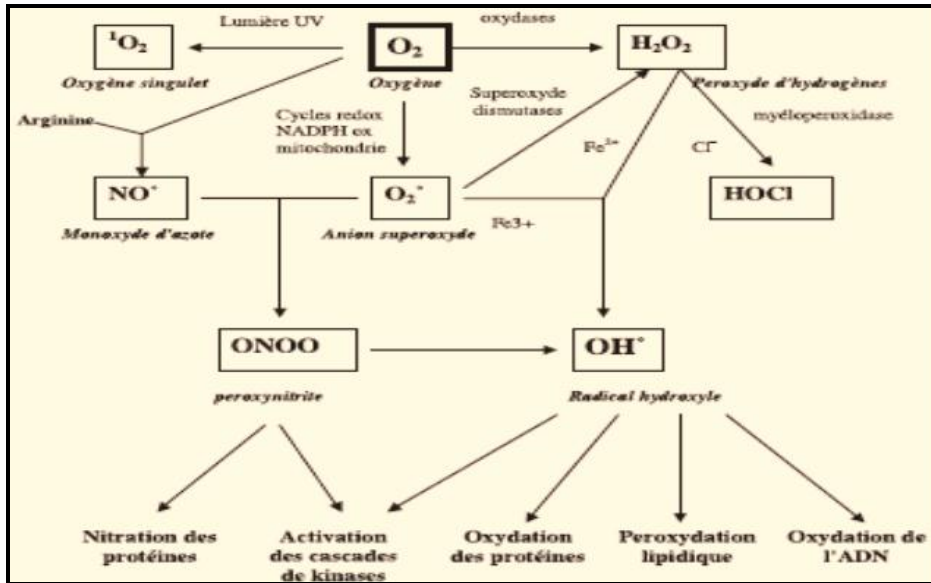
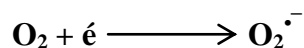


Figure 9: L'origine des différents radicaux libres oxygénés impliqués en biologie (Favier, 2003).

1.1.1. Les ROS radicalaires

❖ L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

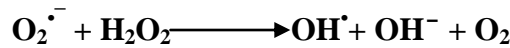
Le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) provient formellement de l'addition d'un seul électron sur le dioxygène (O_2) (Gardès-Albert, 2006).



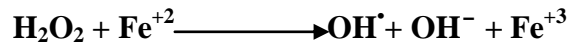
Le superoxyde est le principal précurseur de la plupart des ROS, Sa principale source dans une cellule est le complexe I et le complexe III de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (Piechota-Polanczyk et Fichna, 2014), il possède la plus faible réactivité vis-à-vis des substrats bio-organiques en raison, d'une vitesse faible constante (Migdal et Serres, 2011).

❖ Le radical hydroxyle (OH^{\cdot})

Il est l'un des radicaux libres les plus importants, car il est extrêmement réactif avec presque tous les types de biomolécules y compris les acides aminés, les sucres, les lipides et les nucléotides. Le radical hydroxyle est généré par divers mécanismes, mais le plus important est le mécanisme *in vivo* dû à la décomposition du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène catalysés par la réaction des métaux de transition (réaction de Haber-Weiss):

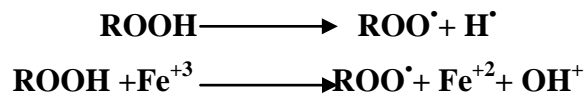


Dans la réaction de Fenton, le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec le fer II (ou le cuivre I) pour générer un radical hydroxyle (Engwa, 2018).



❖ **Le radical peroxyde (ROO[·]) et le alcoxyle (RO[·])**

Les radicaux peroxyde (ROO) et alcoxyle (RO) sont de bons agents oxydants. L'irradiation par la lumière UV ou la présence d'ions des métaux de transition peut provoquer une décomposition des peroxydes pour produire des radicaux peroxyde et alcoxyle.

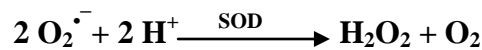


Le (ROO[·]) est formé à partir des lipides, protéines, ADN et glucides lors des dommages oxydatifs. Ils sont générés par une réaction directe de l'oxygène avec des radicaux alkyles (R). (Ozcan et Ogun, 2015).

1.1.2. Les ROS non radicalaires

❖ **Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)**

Il possède des propriétés oxydantes et réductrices en même temps, peu réactif en l'absence des métaux de transition. La principale production de H₂O₂ résulte de la dismutation de l'O₂^{·-} par la SOD selon la réaction suivante :



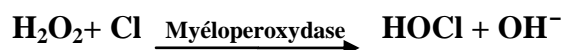
Le peroxyde d'hydrogène diffuse rapidement à travers les membranes cellulaires. Il est possible qu'il soit éliminé en O₂ et H₂O par l'action de la catalase, soit par action directe après interaction avec certaines biomolécules, soit par action indirecte en étant le précurseur des radicaux hydroxyles OH[·] (Bensakhria, 2018).

❖ **L'oxygène singlet (¹O₂)**

C'est un agent oxydant très puissant qui peut directement oxyder des protéines, l'ADN et des lipides et causer des dommages tissulaires (Halliwel, 2006). Il est également formé *in vivo* par l'activation des neutrophiles, des éosinophiles et par certaines autres réactions enzymatiques catalysées par des enzymes, comme les lipoxygénases, les dioxygénases et la lactoperoxydase (Phaniendra et al, 2014).

❖ **L'acide hypochloreux (HOCl)**

L'acide hypochloreux est synthétisé en grande partie par l'action de la myéloperoxydase dans des cellules phagocytaires (par exemple, des neutrophiles) en utilisant le H₂O₂ et l'ion de chlore comme substrats.



D'autre part, l'acide hypochloreux peut être le précurseur des espèces oxydantes puissantes qui réagissent avec les protéines, les lipides, les acides nucléiques et les glucides (Rucker, 2015).

1.2. Les sources des ROS

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être produites d'une manière endogène par l'organisme vivant ou provoquées via des sources exogènes.

1.2.1. Les ROS exogènes

Peuvent être générés par :

- ✓ *L'exposition à l'ozone* peut entraîner une peroxydation des lipides, un afflux de neutrophiles dans l'épithélium des voies respiratoires et une libération des médiateurs inflammatoires tels que MPO et LDH.
- ✓ *L'hyperoxie* peut augmenter la production des espèces réactives d'oxygène (Sahiner et al., 2018).
- ✓ *La fumée de cigarette* contient quant à elle des composés organiques et de nombreux radicaux, comme le superoxyde et l'oxyde nitrique.
- ✓ *Les ions des métaux lourds* tels que le fer, le cuivre, le cadmium et le mercure, peuvent induire la génération de radicaux réactifs et provoquent des lésions cellulaires.
- ✓ *Les radiations ionisantes* en présence de l'O₂, convertissent les radicaux hydroxyles, les superoxydes et les radicaux organiques en espèces d'hydro peroxydés qui réagissent avec les ions métalliques actifs et induisent un stress oxydatif (Birben et al., 2012).

1.2.2. Les ROS endogènes ou cellulaires

Dans les organismes vivants, les ROS sont générés dans plusieurs systèmes cellulaires localisés sur la membrane plasmique, dans le cytosol, dans les peroxysomes et sur les membranes des mitochondries et du réticulum endoplasmique (Di Meo et al., 2016).

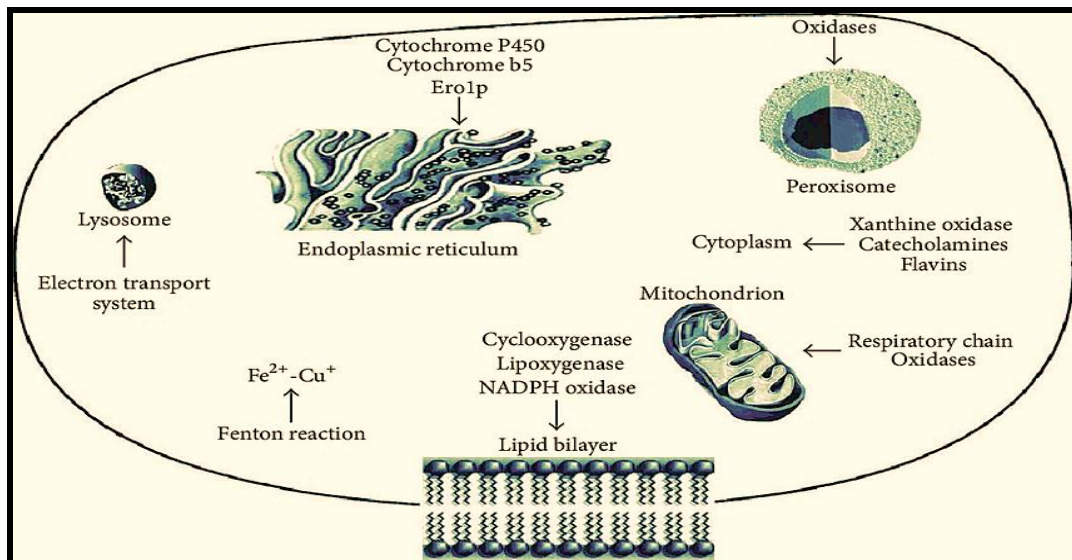


Figure 10: Sources cellulaires de production des ROS (Di Meo et al., 2016).

- ✓ *La NADPH oxydase* est une enzyme présente dans la paroi vasculaire et qui génère le ($O_2^{\cdot-}$) en utilisant le NADH ou NADPH comme substrat.
- ✓ *La xanthine-oxydase* joue un rôle important dans la production des ERO (particulièrement $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2), lors de l'ischémie/reperfusion.
- ✓ *Enzymes de la voie de l'acide arachidonique*, lors du métabolisme de l'acide arachidonique, ce dernier peut être oxydé soit par les cyclooxygénases, soit par les lipooxygénases (métallo-enzymes à fer), pour former entre autre des hydroperoxydes qui sont des précurseurs de leucotriènes, puissants médiateurs de l'inflammation (Salvyre et al., 2003).
- ✓ *les mitochondries* représentent la principale source intrinsèque des ROS via le système de transport d'électrons ou la chaîne respiratoire (Abdal Dayem et al., 2017).

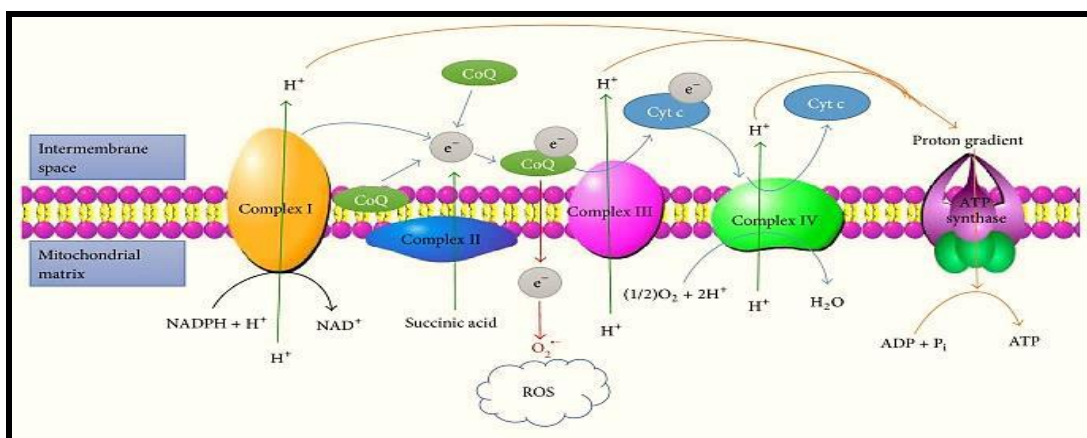


Figure 11: Le transport d'électrons à travers la chaîne respiratoire et la production des ROS.

Complexe I : NADH déshydrogénase, Complexe II : succinate déshydrogénase, Complexe III : Coenzyme Q-cytochrome c réductase, Complexe IV : Cytochrome c oxydase, CoQ10 : Coenzyme Q10. (Li et al., 2017).

- ✓ Les complexes I-IV sont localisés dans la membrane interne mitochondriale. Au cours du transfert des électrons via la chaîne respiratoire, si le complexe III ne peut pas recevoir des électrons du CoQ₁₀, les électrons seraient captés par O₂, qui pourrait produire les ROS et engendrer le stress oxydatif (Li *et al.*, 2017).
- ✓ Les enzymes de la famille des cytochromes P₄₅₀-, assurent l'oxydation des acides gras insaturés (et certains xénobiotiques), réduisent l'oxygène moléculaire pour former le O₂^{•-} et/ou H₂O₂.
 - ✓ **Réticulum endoplasmique**, les ERO ainsi produits semblent intervenir dans la régulation redox de certaines fonctions essentielles du réticulum endoplasmique telles que l'adressage et la sécrétion des protéines.
 - ✓ Les **peroxysomes** sont une source endogène de H₂O₂, par certaines enzymes qu'ils renferment comme les (glycolate oxydase, D-aminoacide oxydase, urate oxydase, hydroxy acide oxydase, acyl-CoA oxydase...) (Beaudeau *et al.*, 2006).

1.3. Les Dommages moléculaires induits par les ROS

Le flux continu des ROS endogène et exogène entraîne des dommages oxydatifs aux composants cellulaires et altère de nombreuses fonctions cellulaires. Les protéiques (Les enzymes), les membranes lipidiques et l'ADN (figure 12) sont parmi les cibles biologiques les plus vulnérables aux dommages oxydatifs (Kohen et Nyska, 2002).

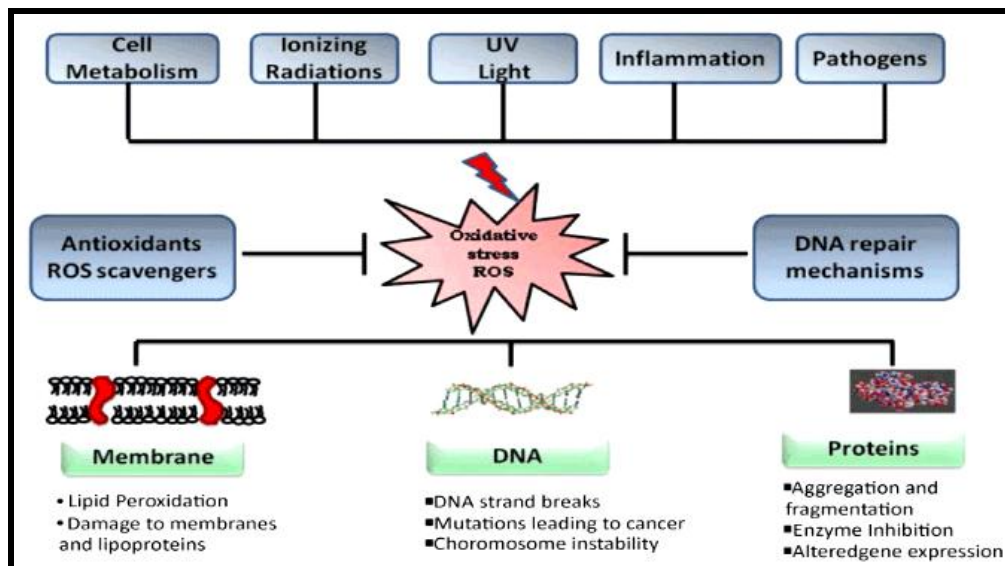


Figure 12 : Les possibles effets du stress oxydatif (Sharma, 2014).

1.3.1. Dommages des lipides membranaires

Les radicaux hydroxyles sont capables de provoquer une peroxydation lipidique dans la membrane plasmique ou celle de tout organelle contenant des grandes quantités des chaînes latérales des acides gras polyinsaturés (AGPI) (Burton et Jauniaux, 2011).

Le mécanisme général de la peroxydation des AGPI implique l'abstraction d'hydrogène d'une molécule lipidique (LH) par un initiateur (R[•]) pour générer un radical libre à base de carbone (L[•]) qui réagit rapidement avec l'oxygène moléculaire pour former le radical peroxyde (LOO[•]) connu pour propager la réaction en chaîne (figure 13). Ce dernier réagit avec les fractions d'AGPI, produisant des hydroperoxydes lipidiques (LOOH) et perpétuant la réaction en chaîne. Les hydroperoxydes peuvent en outre se dissocier en espèces radicalaires dangereuses telles que les aldéhydes bioactifs qui endommagent d'autres composants cellulaires (Ziad et al., 2019).

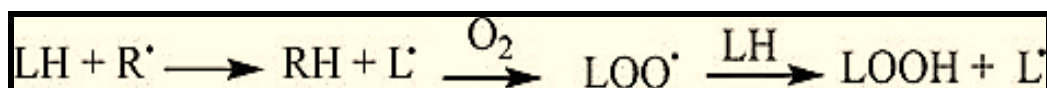


Figure 13: Processus général de la peroxydation lipidique (Ziad et al., 2019).

1.3.2. Dommages de l'ADN

Les dommages oxydatifs causés à l'ADN peuvent être les plus dangereux pour les cellules, car ils affectent le cycle cellulaire et entraînent des mutations et des cancers. L'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle (OH[•]) en 8-hydroxy-2-déoxyguanosine (8-OH-G), qui conduit finalement à un GC → TA transversions lors de la réplication ultérieure de l'ADN. L'altération de l'ADN aurait été en partie responsable des processus du vieillissement, du diabète, des maladies inflammatoires et les maladies du foie (Velavan, 2011).

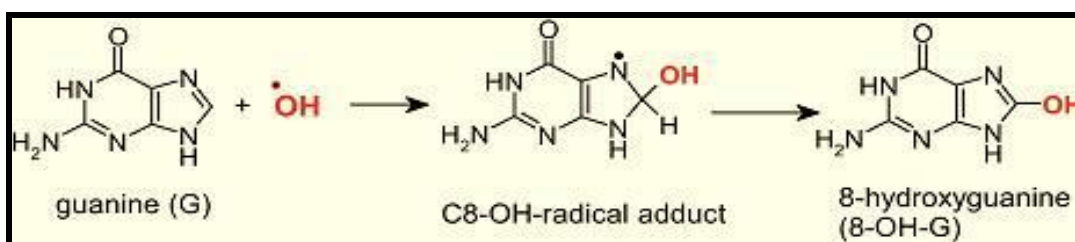


Figure 14: La réaction de la base guanine avec le radical hydroxyle (Jomova et Valko, 2011).

1.3.3. Altérations des protéines

L'oxydation intracellulaire par les ERO peuvent attaquer les chaînes latérales des acides aminés des protéines, et peuvent générer des protéines carbonylées, qui sont

considérées comme des marqueurs du stress oxydant des protéines qui s'accumulent au cours du vieillissement ou de diverses pathologies liées à l'âge. Bien que la plupart des acides aminés puissent être modifiés, certains d'entre eux comme la cystéine, la tyrosine et la méthionine sont particulièrement sensibles à l'action des radicaux hydroxyles, comme l'acide peroxy-nitrique et l'acide hypochloreux (Therond, 2006).

Les effets de l'oxydation des protéines peuvent être observés en cas de repliement des protéines, d'oxydation des chaînes latérales et de fragmentation du squelette, entraînant une perte de leur fonction et un arrêt de nombreux processus biochimiques (Rosângela *et al.*, 2016). Les protéines qui sont sensibles à l'oxydation sont les phosphatases, les kinases, les facteurs de transcription et les enzymes métaboliques (Deavall *et al.*, 2012).

2. Stress oxydant et pathologies humaines

Un dénominateur commun dans la pathogénie de la plupart des maladies chroniques est l'engagement du stress oxydatif, affectant des processus cellulaires différents, comme la prolifération, le métabolisme, la différenciation et la survie (Gasparrini *et al.*, 2017), et des organes spécialisés ou les systèmes, notamment les poumons, le foie et les reins, le système nerveux et le système cardio-vasculaire (Palipoch et Koomhin, 2015).

Tableau 4 : les relations entre les maladies et le stress oxydant (Favier, 2006).

Maladies dues à une production insuffisante de radicaux libres	Maladies où le stress oxydant est la cause primordiale	Maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs	Maladies entraînant un stress oxydant secondaire
<ul style="list-style-type: none"> • Agranulomatose septique • Psoriasis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cancers • Autoimmunité • Cataracte, Dégénérescence maculaire, Sclérose latérale amyotrophique • Photo-veillissement cutané • Photosensibilisation • Irradiation • Intoxications : CCl₄, Cd, Fe, alcool, • Hémochromatose. 	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie d'Alzheimer • Stérilités masculines • Maladies virales • Rhumatismes • Athérome • Asthme • Insuffisance respiratoire. 	<ul style="list-style-type: none"> • Diabète • Insuffisance rénale • Mucoviscidose • Sida, Choc septique • Infarctus du myocarde • Ischémies/reperfusion • Parkinson, Brûlures • Thalassémie, Greffes d'organes. <p>Traitements :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anticancéreux • Oxygène hyperbare.

3. Les systèmes antioxydants

3.1. Les antioxydants

Le concept d'antioxydant biologique désigne tout composé qui, lorsqu'il est présent à une concentration inférieure à celle d'un substrat oxydable, est capable de retarder ou d'empêcher l'oxydation de ce substrat.

Les premiers types de système de défense antioxydants mis au point contre les dommages oxydatifs sont ceux qui empêchent la formation des ROS et ceux qui bloquent et capturent, les radicaux qui se forment (**Pisoschi et Pop, 2015**).

Il existe deux systèmes antioxydants très complexes (enzymatique et non enzymatique), qui travaillent en synergie, et en combinaison les uns avec les autres pour protéger les cellules et les organes du corps contre les dommages des radicaux libres (**Rahman, 2007**).

3.2. Les différents types d'antioxydants

3.2.1. Système antioxydant enzymatique

❖ Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases (SOD) constituent la première ligne de protection contre les dérivés radicalaires de l'oxygène. (**Vergely et Rochette, 2003**). Ils sont présents dans presque toutes les cellules aérobies et dans les liquides extracellulaires. (**Kabel, 2014**). Les SOD sont l'un des antioxydants les plus puissants, ils catalysent la conversion d'anions superoxydes en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène (**Kurutas, 2016**).

❖ La catalase

La catalase est une enzyme oxydoréductrice, car elle joue un rôle crucial dans la désactivation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Par conséquent, il agit comme un antioxydant qui protège la cellule contre le stress oxydatif. Le mécanisme du fonctionnement de cette enzyme implique la décomposition ultérieure de (H₂O₂) en oxygène et en eau, réduisant ainsi le stress oxydatif causé par ce substrat (**Kaushal et al., 2018**).

❖ La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme cytosolique qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (**Fanucchi, 2014**). De plus, la GPx fait partie du réseau antioxydant enzymatique cellulaire responsable de l'élimination des peroxydes organiques et inorganiques (**Morris et al., 2014**).

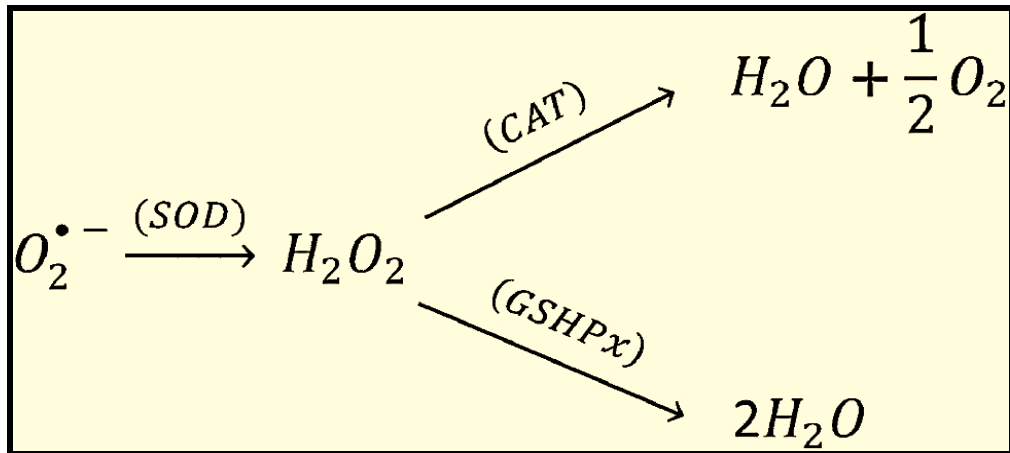


Figure 15 : Activité de balayage radicalaire des SOD, CAT et GPx (Nimse et Pal, 2015).

❖ Le système thiorédoxine

Le système thiorédoxine comprenant le NADPH, la thiorédoxine réductase (Trx R) et la thiorédoxine (Trx), est un système majeur à base de disulfure réductase (Lu et Holmgren, 2014) capable de protéger les cellules du stress oxydatif au moyen de leur site actif, la 2-cystéine, qui réagit avec les ROS et capable de réduire les protéines oxydées. Elles servent également de donneurs d'hydrogène aux peroxydes réductases dépendantes de la thiorédoxine (Marengo et al., 2016).

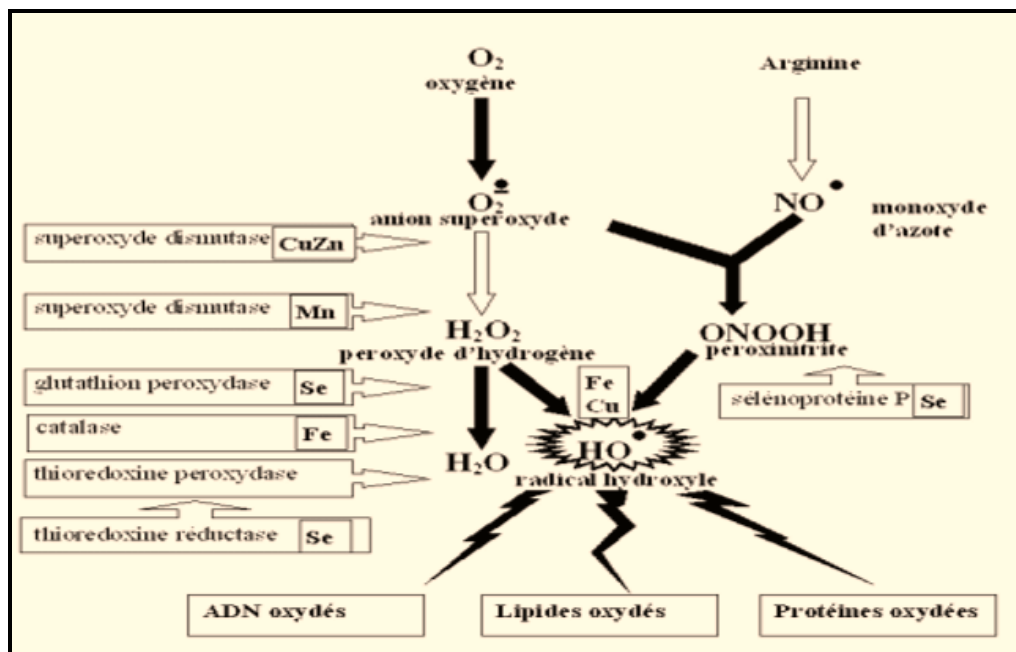


Figure 16: Systèmes antioxydants enzymatiques (Favier, 2006).

3.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques (les molécules antioxydantes)

❖ Le Glutathion (GSH)

Le glutathion (GSH) est un composé de faible poids moléculaire composé de trois acides aminés (acide glutamique, glycine, cystéine). Il s'agit d'un antioxydant soluble présent dans le cytoplasme, les mitochondries et le noyau. Le GSH en tant qu'antioxydant participe à plusieurs lignes de défense contre les ROS, joue un rôle important dans la réparation des cellules et les molécules endommagées (protéines, acides nucléiques et lipides) dans les processus de peroxydation. Le GSH régénère d'autres antioxydants oxydés en petites molécules, par exemple la vitamine C et la vitamine E ([Mirończuk-Chodakowska et al., 2018](#)).

❖ Les vitamines

✓ Vitamine C

L'acide ascorbique est un antioxydant hydrosoluble et fonctionne mieux en milieu aqueux que la vitamine E. Le rôle de la vitamine C en tant qu'antioxydant est double, il peut directement piéger les radicaux superoxydes, hydroxyles et hydroperoxydes lipidiques. De plus, la vitamine C joue un rôle important dans le recyclage de la vitamine E à son état réduit ([Powers et al., 2004](#)).

✓ Vitamine E

La vitamine E est le principal antioxydant liposoluble du système antioxydant cellulaire et provient exclusivement de l'alimentation. La vitamine E protège les acides gras polyinsaturés et les autres composants des membranes cellulaires et des lipoprotéines de basse densité de l'oxydation par les radicaux libres. La forme la plus importante est le α -tocophérol ([Böhm, 2018](#)).

❖ Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont un groupe des pigments naturels responsables de la pigmentation des plantes et des micro-organismes, mais jouent également un rôle crucial dans les systèmes biologiques ([Young et Lowe, 2018](#)). Les propriétés antioxydantes des caroténoïdes sont liées à leur grande capacité de don d'électrons. Les caroténoïdes caractérisés comme des piègeurs excellents des radicaux peroxydes, et jouent un rôle important dans la protection des membranes cellulaires et des lipoprotéines contre ces radicaux ([Santos-Sánchez et al., 2019](#)).

❖ Coenzyme Q₁₀

CoQ₁₀ est une vitamine liposoluble, un cofacteur essentiel dans la phosphorylation oxydative mitochondriale. Il agit comme d'un porteur d'électrons mobiles ([Belviranli et](#)

Okudan, 2015). Il neutralise les radicaux libres même après leur formation. Le rôle important de ce coenzyme est la régénération de la vitamine E. Ce coenzyme est présent dans toutes les cellules et les membranes et joue un rôle important dans d'autres processus de métabolisme cellulaire. (**Mehta et Gowder, 2015**).

❖ Les oligo-éléments

Plusieurs oligo-éléments sont impliqués dans l'activité catalytique et une conformation particulière des enzymes antioxydantes, peuvent contribuer à atténuer le stress oxydatif (**Hosseinimehr, 2015**) et dans ce cadre, elle incombe sur trois oligo-éléments le cuivre, le zinc et le sélénium. A concentration physiologique, le cuivre et le zinc agissent comme "antioxydants" en étant les deux cofacteurs responsables de la bonne activité de la SOD, ainsi que le zinc qui est impliqué dans la synthèse des métallothionines antioxydantes. Le sélénium est le co-facteur de la GPx qui favorise l'élimination des lipides oxydés (**Pincemail et al., 2009**).

❖ L'acide urique

Produit final majeur du métabolisme des purines chez l'homme, un piègeur puissant des radicaux (OH^\bullet , ROO^\bullet , $\text{NOO}^\bullet \dots$), ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C) (**Haleng et al., 2007**).

❖ Biomolécules d'origine végétale

En fait, les antioxydants, en particulier les composés phénoliques, sont abondants dans plusieurs plantes médicinales (**Djeridane et al., 2006**). Récemment, ces composés phénoliques d'origine naturelle sont révélés par leur activité antioxydante indirecte, pouvant entraîner une réduction du stress oxydatif (**Das et al., 2014**). Cette capacité antioxydante est due à leur structure, en particulier la facilité avec laquelle un atome d'hydrogène d'un groupe hydroxyle aromatique peut être donné aux radicaux libres (**Choudhary et Swarnkar, 2011**).

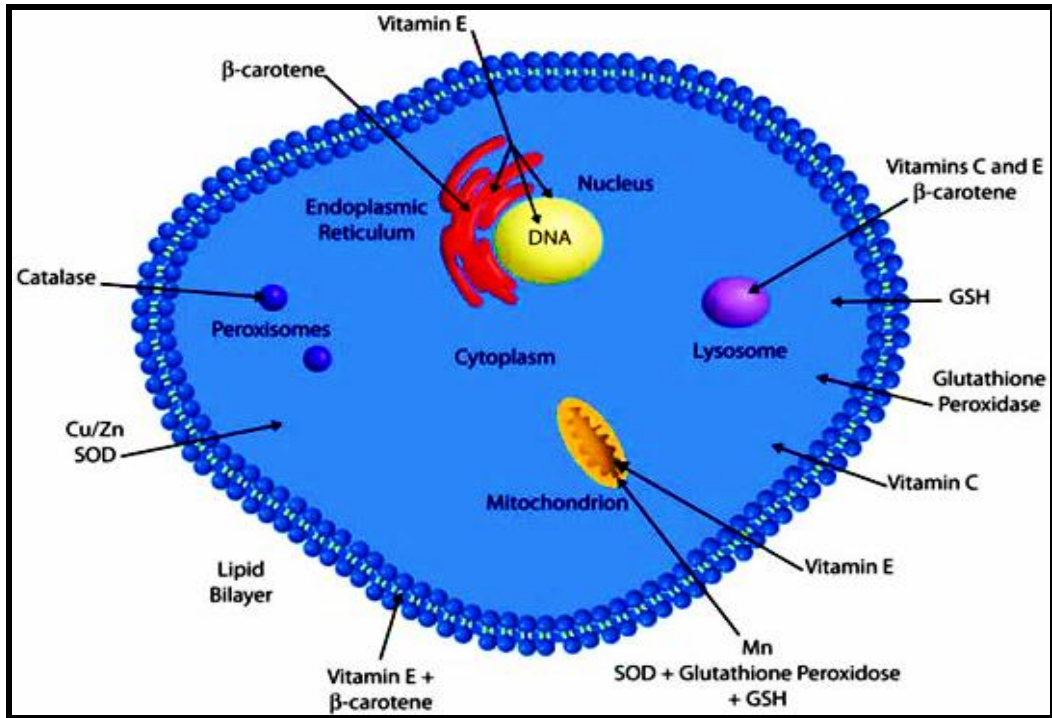


Figure 17: Représentation schématique du site du système de défense antioxydant (enzymatique et non enzymatique) au niveau cellulaire (Mehta et Gowder, 2015).

V. Les polyphénols

1. Définition

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des plantes que l'on trouve naturellement dans tous les végétaux, y compris les produits alimentaires à base de plantes (Huyut *et al.*, 2017). Ces composés phénoliques représentent une grande famille des composés organiques avec de multiples unités phénoliques.

Les polyphénols jouent un rôle important chez les plantes et les animaux, y compris la régulation des hormones en tant que molécules de signalisation, les prévention des UV, les effets antioxydants et la prévention des infections microbiennes (Dai *et al.*, 2019).

2. Classification chimique des polyphénols

Les polyphénols comprennent une gamme diversifiée de molécules, plus de 8000 polyphénols ont été identifiés à ce jour, qui a en commun un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés au sein de leur structure. Sur la base de leurs caractéristiques chimiques, les polyphénols peuvent être classés en différents groupes en fonction du nombre des cycles phénoliques contenus et des éléments structurels qui lient ces cycles entre eux (Piccolella *et Pacifico*, 2015).

Ces molécules comprennent de multiples sous-classes telles que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et lignanes, comme illustré dans la (figure 18). D'autant plus que, ces flavonoïdes constituent le groupe le plus largement connu de ces composés (Cutrim *et Cortez*, 2018).

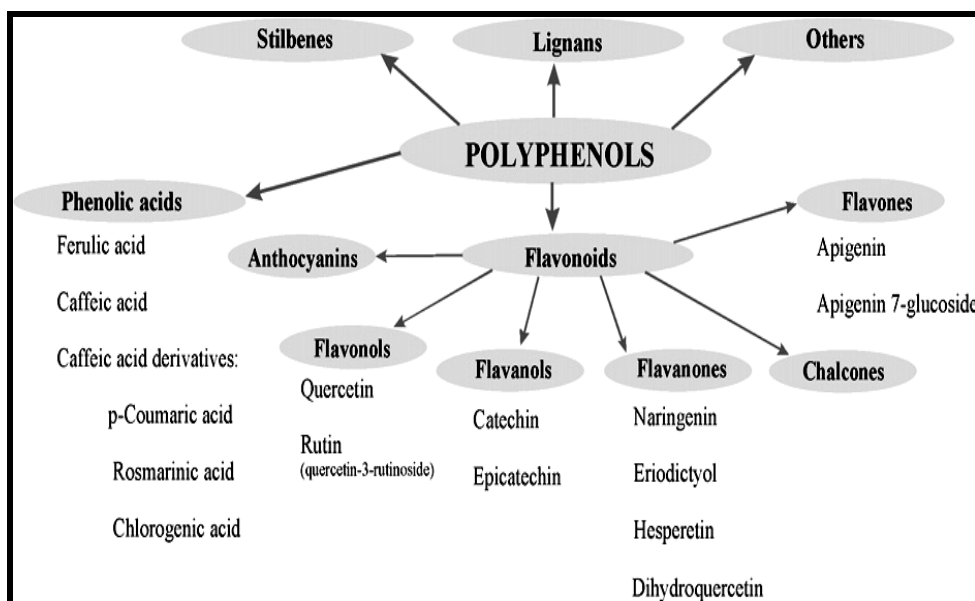


Figure 18 : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe.

(Boros *et al.*, 2010).

2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances phénoliques hydroxylées et sont synthétisés par les plantes en réponse à une infection microbienne (Karak, 2019), ils représentent la classe majeure de ces composés polyphénoliques et qui sont des métabolites secondaires naturels des plantes et trouvés en grande partie dans les aliments et les boissons, tels que les fruits, légumes, céréales, thé, café etc ... (Seleem et al., 2017).

La structure générale des flavonoïdes montre que ces composés sont constitués d'un squelette à 15 atomes de carbone, contenant 2 cycles benzéniques reliés par une chaîne de liaison à 3 atomes de carbone, selon la structure chimique, le degré d'oxydation et l'insaturation de la chaîne de liaison (C3) (Rodríguez-García et al., 2019), les flavonoïdes sont classés en six sous-classes en fonction de leurs structures chimiques: flavones, flavonols, flavanones, isoflavones, flavan-3-ols et anthocyanidines (Choy et al., 2019).

Tableau 5: Les sous-classes des flavonoïdes et leurs sources alimentaires (Karak, 2019).

Sous-classe des flavonoïdes	Exemples de composés	Source de nourriture
Flavonol	Kaempferol, quercétine, myricétine et tamarixétine.	Oignon, vin rouge, chou frisé, huile d'olive, pommes de brocoli, cerises, baies et pamplemousse et thé.
Flavones	Chrysin, apigénine Rutine, lutéoline et glucosidestangerétin.	Peaux de fruits, vin rouge, sarrasin, poivron rouge, peau de tomate, persil.
Flavonones	Naringine, naringénine, taxifoline et hespéridine.	Agrumes, pamplemousses, citrons et oranges.
Flavan-3-ols	Catéchine, épicatechine, épigallocatechine, glausan-3-épicatechine.	Pomme, thé.
Anthocyanidines	Apigénidine, cyanuration, delphinidine, pelargonidine.	Cerises, framboises, fraises et raisins.
Isoflavones	Genistein, daidzein.	Fèves de soja, légumineuses.

2.2. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques trouvés dans divers familles des plantes, leur structure est basée sur le squelette C6 – C2 – C6, définie par deux cycles aromatiques par un pont éthylène. Le stilbène le plus connu et le mieux caractérisé est le resvératrol (3, 4,5-trihydroxystilbène). La présence des stilbènes dans l'alimentation humaine est cependant limitée à quelques aliments comme le raisin, le vin rouge, les arachides et certains types de baies (El Khawand *et al.*, 2018).

2.3. Les lignanes

Les lignanes sont formés de deux unités phényl-propane et d'un pont à quatre carbones, ce qui conduit à de nombreuses structures chimiques différentes dans la nature. La plus grande quantité de ces composés se trouve dans les graines de lin, et d'autres sources précieuses sont les céréales et certains légumes. Les lignanes sont l'une des principales classes de phytoestrogènes, avec les isoflavones (Mrduljaš *et al.*, 2017).

2.4. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont l'une des principales classes de composés phénoliques présents dans les plantes et se présentent sous forme d'esters, de glycosides ou d'amides, mais rarement sous forme libre. La variation structurelle des acides phénoliques dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyle sur le cycle aromatique. Les acides phénoliques ont deux structures distinctes: l'acide hydroxycinnamique et l'acide hydroxybenzoïque. Les acides benzoïques les plus communs sont l'acide vanillique, gallique, syringique et Protocatechuique. Les acides cinnamiques les plus courants sont l'acide *p*-coumarique, caféique, férulique (Tanase *et al.*, 2019).

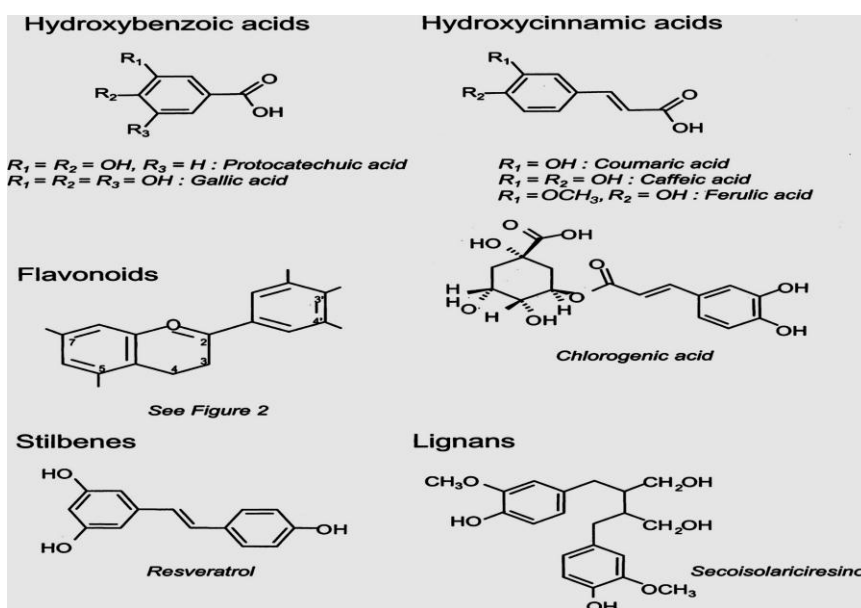


Figure 19 : Structures chimiques des polyphénols courants (Cutrim et Cortez, 2018).

3. Effets biologiques des polyphénols

Dans le corps humain, les polyphénols exercent le rôle d'antioxydants et ont diverses propriétés biologiques (Kumar et Baojun, 2017).

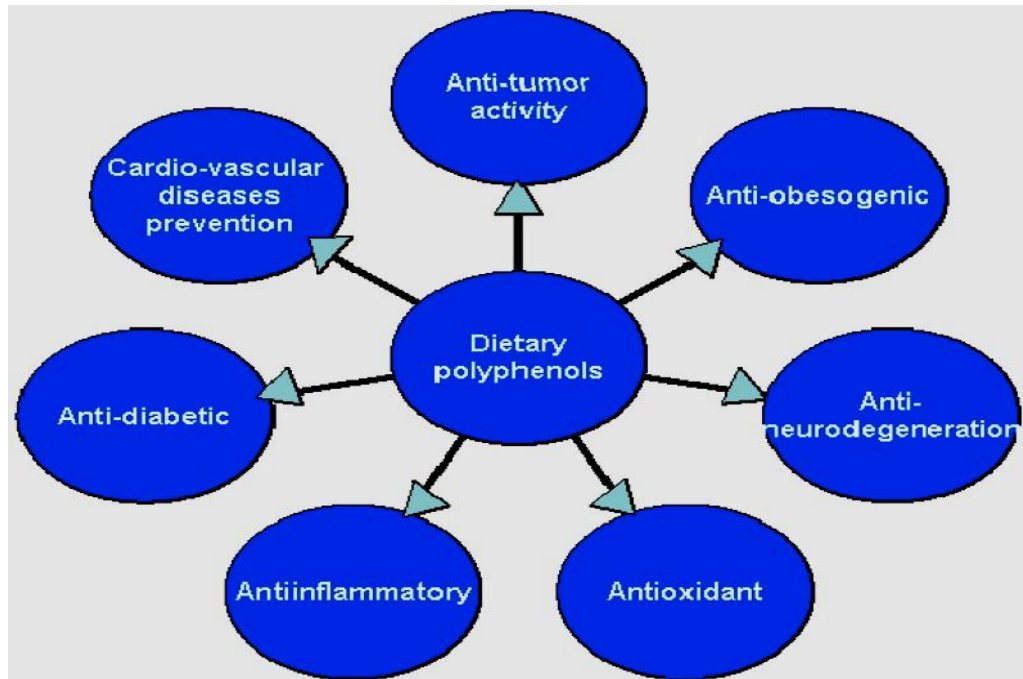


Figure 20 : Les propriétés biologiques des polyphénols alimentaires sont importantes dans la prévention des maladies liées au mode de vie (Koch, 2019).

3.1. L'activité antioxydante

Il s'agit probablement de l'activité biologique la plus étendue et la plus fréquemment décrite des polyphénols, qui en raison de leurs structures peuvent être liées à presque tous les composés de ce groupe. Le mécanisme d'action de ces composés peut inclure plusieurs voies différentes exemple le balayage direct des ROS; inhibition des enzymes ou des oligo-éléments chélateurs, qui sont impliqués dans la génération de radicaux libres (par exemple, le cuivre ou le fer); augmentation de la production des antioxydants endogènes (par exemple, SOD (Super Oxyde Dismutase et glutathion) (Koch, 2019).

3.2. Activité antimicrobienne

Parmi les polyphénols, les flavan-3-ols, les flavonols et les tanins attirer le plus d'attention en raison de leur activité antimicrobienne élevée par rapport à d'autres polyphénols, et du fait que la plupart d'entre eux sont capables de supprimer un certain nombre de facteurs de virulence microbienne (l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion des ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes) et montrent une synergie avec les antibiotiques (Daglia, 2012).

3.3. Activité anti inflammatoire

Les flavonoïdes, la curcumine, le lycopène (un caroténoïde hydrocarboné linéaire insaturé présent dans la tomate) et les stilbénoides ont inhibé les facteurs de transcription pro-inflammatoire (NF- κ B, AP-1) pour supprimer la synthèse et la libération de TNF- α , IL-6, synthase inductible de l'oxyde nitrique. Ainsi que dans les modèles *in vivo*, le resvératrol, la curcumine et les flavonoïdes ont inhibé l'activité des enzymes métabolisant l'acide arachidonique, la COX et la lipoxygénase, et ont supprimé la production de médiateurs de l'inflammation, de l'acide arachidonique, des prostaglandines et des leucotriènes, grâce à la modulation des seconds messagers (AMPc, GMPc, protéines kinases et calcium) (Naoi,2019).

3.4. Activité anti cancérogène

Les composés polyphénoliques ont la capacité d'inhiber la prolifération des différents types de cancer tels que les cancers de la prostate, de la vessie, des poumons, gastro-intestinaux, du sein et des ovaires. Par exemple, la quercétine, le resvératrol, les polyphénols de thé vert, l'épigallocatechine-3-gallate et la curcumine ont démontré leur efficacité en tant que composés anticancéreux. Les polyphénols sont capables de prévenir l'initiation du cancer (cyto-protecteur), la progression, la récurrence et les métastases dans les organes distants (effet cytotoxique) (Yahfoufi *et al.*, 2018).

3.5. Activité neuroprotectrice

Plusieurs mécanismes neurochimiques sous-jacents à l'action protectrice des polyphénols ont été décrits: propriétés chélatantes du fer; modulation des voies de signalisation liées à la survie et à la différenciation neuronales; inhibition des processus neuropathologiques; et régulation de la fonction mitochondriale. D'autres mécanismes par lesquels les flavonoïdes peuvent être neuroprotecteurs incluent leur rôle positif sur le flux sanguin périphérique et cérébrovasculaire, affectant finalement les processus de plasticité synaptique et la fonction cognitive (Figueira *et al.*, 2017).

4. Aperçu bibliographique sur le genre *Centaurea*

4.1. Le genre *Centaurea*

Le genre *Centaurea* de la famille des Astéracées est l'un des genres de plantes les plus répandus dans le monde. Ce genre comprend plus de 500 espèces, dont 45 poussent spontanément en Algérie, dont 7 espèces localisées au Sahara (Belbache *et al.*, 2017). Les *Centaurees* sont des plantes à résine ou à essence sans latex, ils se multiplient par touffes ou par semis, généralement au printemps. Elles se rencontrent sur différents types d'habitats (Hellwing, 2004).



Figure 21 : Photographies du genre *Centaurea*, avec un accent particulier sur le sous-genre *Centaurea* et la secte (Hilpold et al., 2014).

4.2. Description botanique du genre *Centaurea*

Les centaurées sont des plantes annuelles (rarement biannuelles) ou herbacées, comme pour toutes les espèces des Asteraceae; leurs fleurs sont disposées en capitule constituée de fleurs centrales tubulaires hermaphrodites et plus ou moins irrégulières et de fleurs périphériques stériles, leurs couleurs varient le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet. L'involucre peut être ovoïde ou globuleux à bractées inégales imbriquées sur plusieurs rangs par fois surmontées par un appendice. Le réceptacle est garni de soie abondante. Les anthères sont soudées à la base, le style est à branches courtes, si les aigrettes sont présentes elles peuvent être persistantes ou caduques (Quezel et Santa, 1963).

4.3. L'espèce *Centaurea maroccana*

C'est une plante épineuse florale qui s'épanouie en fin de printemps. Ses tiges sont de longueur qui varie entre 20 et 40 cm et ses fleurs avec épines sont de couleur jaune et de taille moyenne (Bentamene, 2004).



Embranchement: Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Asterales

Famille : Composées

Sous-famille : Tubiflores

Tribu : Cynarées

Genre : *Centaurea*

Espèce : *Centaurea maroccana*

Figure 22 : Classification botanique de l'espèce *Centaurea maroccana* (Bentamene, 2004).

4.4. Composition chimique du genre *Centaurea*

Les espèces de *Centaurea* sont bien connues pour leur grande diversité structurale dans les principaux composés bioactifs, notamment les triterpènes, les flavonoïdes, les lignanes, les acides gras et les lactones sesquiterpéniques (Belbache *et al.*, 2017).

Les flavonoïdes ont été signalés dans de nombreuses espèces *Centaurea* et près de 80 taxons ont été étudiés pour leur contenu en flavonoïdes, isolées à partir des feuilles, des parties aériennes et parfois des racines de nombreuses espèces de *Centaurea*, et identifiés comme des flavones, des flavonols, 6-deoxyflavones, et leurs O-et C-glycosides (Mishio *et al.*, 2006).

4.5. Les vertus médicinales et les propriétés biologiques des *Centaurées*

Différentes espèces du genre *Centaurea* sont traditionnellement utilisées pour plusieurs affections, notamment l'abcès, l'asthme, les maux d'estomac, les hémorroïdes, la diarrhée et le rhume (Zengin *et al.*, 2016), en raison de leurs activités biologiques importantes qui caractérisent les différentes espèces appartenant à cette plante (Khammar et Djeddi, 2012) telles que antipelluculaire, anti-diarrhéique, antirhumatismales, anti-inflammatoire,

cholérétique, diurétique, digestive, stomachique, astringent, antipyrétique, cytotoxique et antibactériennes pour ces espèces (Bülent Köse *et al.*, 2007).

Parmi les effets biologiques exercés par les espèces de *Centaurea*, il a été noté que plusieurs espèces ont été particulièrement recommandées contre :

- ✓ Les cas inflammatoires tels que les abcès (*Centaurea iberica* Trev. Ex Sprengel), l'asthme (*Centaurea iberica* Trev. Ex Sprengel), les hémorroïdes (*Centaurea drahifolia* Sm.)
- ✓ Les thés préparés à partir des parties aériennes de différentes espèces *Centaurea* sont également utilisés comme hypoglycémiant, tels que *Centaurea ornato*, *Centaurea aspera*, *Centaurea seridis* var. *maritima* et *Centaurea melitensis* (Akkol *et al.*, 2009).
- ✓ Des tests de recherche des activités biologiques d'extrait chloroformé de l'espèce algérienne *C. musimomum* a montré des activités cytotoxiques et antiparasitaires (Medjroubi *et al.*, 2005).

Deuxième partie: Etude expérimentale

❖ Matériel et Méthodes

- *Etude expérimentale in vitro*
- *Etude expérimentale in vivo*

❖ Résultats

- *Résultats de l'étude expérimentale in vitro*
- *Résultats de l'étude expérimentale in vivo*

❖ Discussion

- *Discussion de l'étude expérimentale in vitro*
- *Discussion de l'étude expérimentale in vivo*

I. Matériels et méthodes

1. Etude *in vitro*

1.1. Matériel biologique végétal

Notre étude a porté sur une plante endémique algérienne d'intérêt biologique, il s'agit de *Centaurea maroccana*, qui a été collectée au stade de floraison dans la région de Biskra (coordonnées GPS: 34°50'13.326"N et 5°45'3.7728" E) et authentifiée par le professeur M. Kaabeche (Laboratoire de Phytothérapie Appliquée aux Maladies Chroniques, Département de biologie, Université Ferhat Abbas, Sétif 1, Algérie) sur la base de (Quezel et Santa, 1963). Un spécimen de pièce justificative (CCM12 / 04/02) a été déposé à l'Herbier du Département de Biologie de l'Université Frères Mentouri, Constantine 1.

1.2. Préparation de l'extrait

Les parties aériennes séchées à l'air (feuilles et fleurs, 2700g) de *Centaurea maroccana* ont été réduites en poudre (broyage léger à température contrôlée, jusqu'à 35 ° C) et macérées à température ambiante avec MeOH /H₂O (80:20, v / v) trois fois (24 heures pour chaque fois). Les filtrats ont été combinés, concentrés sous pression réduite (jusqu'à 35 °C), dilués dans H₂O (1000 ml) sous agitation magnétique et maintenus à 4°C pendant une nuit pour précipiter un maximum de chlorophylles. Après filtration, la solution résultante a été extraite successivement avec des solvants de polarités croissantes: chloroforme (CHCl₃), d'éthyle acétate (EtOAc) et n-butanol (*n-BuOH*). Les couches organiques ont été séchées avec du Na₂SO₄ anhydre, filtrées et concentrées sous vide à température ambiante (Zater et al., 2016) pour obtenir les rendements des extraits suivants CHCl₃ (12,5 g, rendement: 0,46%), EtOAc (20 g, rendement: 0,74%) et *n-BuOH* (40 g, rendement: 1,48%). Ce travail a été réalisé au niveau de l'Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Faculté des Science Exactes, Université des Frères Mentouri.

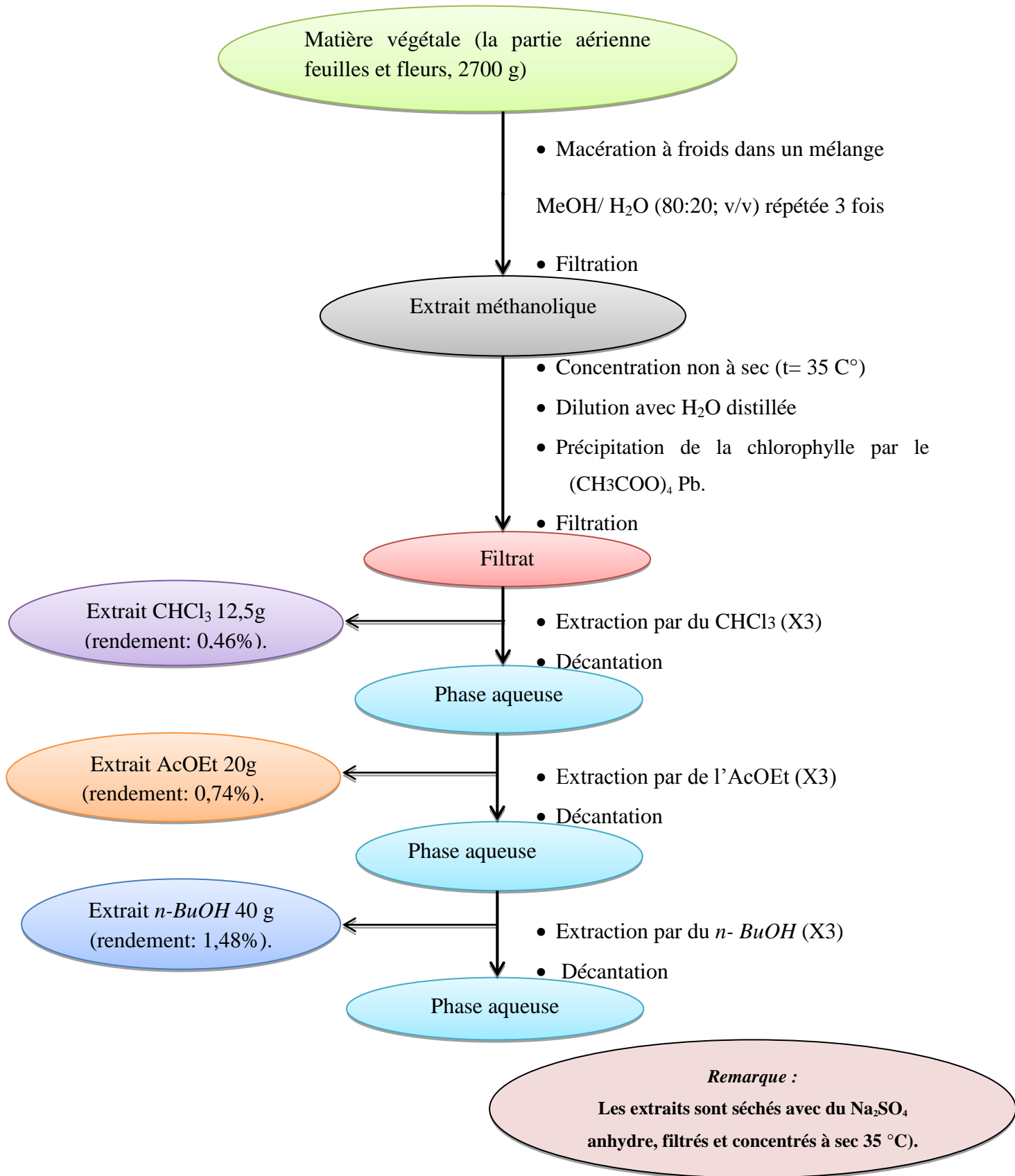


Figure 23 : Protocole d'extraction de la plante *Centaurea maroccana*.

1.3. Etude phyto-chimique

1.3.1. Détermination de la teneur totale en phénols

La teneur totale en composés phénoliques de l'extrait a été déterminée par spectrophotométrie (les mesures des bio-activités ont été effectuées sur un lecteur microplaque à 96 puits « Perkin Elmer EnSpire » au Centre National de Recherche en Biotechnologie, Constantine), en employant le réactif de Folin-Ciocalteu (Muller *et al.*, 2010), avec une modification mineure. Ensuite 1 mg d'extrait est dissout dans un volume de 1 ml de méthanol, et 20 µl d'extrait à diverses concentrations ont été mélangés avec 100 µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 1:10 et 75 µl de solution de carbonate de sodium (75g/l) dans les puits de la microplaque dans l'obscurité à la température ambiante. Après 2 h, l'absorbance a été mesurée à 740 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol).

La quantification des polyphénols totaux a été faite à l'aide d'une courbe d'étalonnage, réalisée par l'acide gallique à différentes concentrations. La teneur totale en composés phénoliques a été exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg GAE/mg d'extrait).

1.3.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes

La mesure de la teneur totale en flavonoïdes de l'extrait était basée sur la méthode décrite par (Topçu *et al.*, 2007) avec des légères modifications pour une détermination sur microplaque à 96 puits. Dont 1 mg d'extrait est dissout dans un volume de 1 ml de méthanol. A un volume de 50 µl d'extrait à diverses dilutions on ajoute 130 µl (MeOH), 10 µl de potassium acétate (CH₃COOK) préparés dans de l'eau et 10 µl de la solution aqueuse de nitrate d'aluminium (Al(NO₃)₂, 9H₂O). L'absorbance est lue à 415 nm, après incubation à température ambiante pendant 40 min. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 µl extrait + 150 µl méthanol).

La quantification des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine, comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en µg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (µg QE/mg d'extrait).

1.3.3. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

Une analyse LC-MS/MS a été réalisée pour quantifier et identifier les polyphénols présents dans l'extrait *n*-butanol dans le laboratoire de chimie, Département de chimie, Faculté des sciences et des lettres, Université Tokat Gaziosmanpasa, Turquie, en utilisant une

colonne Thermo Scientific -Dionex Ultimate 3000 -TSQ Quantum avec Thermo ODS Hypersil 250 × 4,6 mm, une colonne de 5 µm a été utilisée pour l'analyse quantitative, le volume d'injection était de 20 µl. La phase mobile comprenait l'éluant A : l'eau avec 0,1% d'acide formique et l'éluant B : du méthanol, le débit était de 0,7 ml/min à 40 °C. Le programme de gradient a été fixé comme suit: 0-1 min, 100% A, 5-20 min, 95% A, 1-22 min, 5% A, 25 min, 5% A, 30 min 0% A, le processus total a duré 30 min. L'extrait a été préparé à 1mg/1ml et analysé et la relation entre la surface du pic et la concentration s'est avérée linéaire de 0,5 à 10 mg/l (ppb) pour chaque composé. La linéarité a été évaluée en utilisant une analyse de régression linéaire de six points pour chaque composé et le tracé linéaire se compose de trois répétitions par point. Pour toutes les analyses, les coefficients de corrélation (valeurs R₂) étaient ≥0,99.

Les valeurs LOD et LOQ des composés pour la méthode LC-MS / MS sont effectuées et la LOD et la LOQ ont été déterminées en utilisant des mesures de blancs réactifs dopés avec de faibles concentrations d'analyse selon EURACHEM GUIDE. La solution à blanc a été enrichie de 0,1 ppm (Abid et al., 2017).

1.4. Evaluation de l'activité antioxydante

1.4.1. Effet anti-radicalaire par le test au DPPH[•]

L'activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH (Blois, 1958). En bref, 40 µl de solution de MeOH d'extrait à diverses concentrations ont été ajoutés à 160 µl de DPPH (0,1mM). Le mélange réactionnel agité vigoureusement et l'absorbance du DPPH restant a été mesurée à 517 nm après 30 min. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards antioxydants pour la comparaison de l'activité. La capacité de piégeage du radical DPPH a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Inhibition \%} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs Extrait}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

*Abs contrôle est l'absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs.

*Abs Extrait est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

Les résultats ont été donnés sous forme d'IC₅₀ (µg/ml) correspondant à la concentration de 50% d'inhibition.

1.4.2. Essai de décoloration du radical cation ABTS^{•+}

L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage ABTS^{•+} a été déterminée conformément à la méthode de (Re et al., 1999). Le radical cation ABTS est généré en mélangeant 7 mM d'une solution aqueuse d'ABTS avec 2,45 mM de persulfate de potassium,

le tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 16 h avant utilisation, la solution obtenue est diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,025$ à 734 nm. Ensuite, 160 μ l de solution ABTS ont été ajoutés à 40 μ l de solution d'extrait dans le méthanol à différentes concentrations. Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le méthanol a été utilisé comme témoin, le BHA et le BHT ont été utilisés comme des normes antioxydants pour la comparaison de l'activité d'extrait.

La capacité de piégeage de l'ABTS^{•+} a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Inhibition \%} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs Extrait}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

1.4.3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

L'activité antioxydante par réduction cuprique a été déterminée selon la méthode CUPRAC (Apak *et al.*, 2004). Dans chaque puits, le mélange réactionnel contenant 40 μ l de l'extrait à différentes concentrations, 50 μ l d'une solution de chlorure de cuivre (II) (Cu Cl₂, 2H₂O), 50 μ l de solution alcoolique de néocuproïne et 60 μ l de tampon aqueux d'acétate d'ammonium à pH 7.

Après une heure de temps et à l'aide d'un lecteur de microplaques, l'absorbance a été enregistrée à 450 nm. Les résultats ont été calculés à titre de A_{0,50} (μ g/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme des normes antioxydants.

1.4.4. Test de blanchissement de β -carotène

L'activité de blanchissement de la β -carotène a été évaluée en utilisant la méthode décrite par (Marco, 1968). Une masse de 0.5 mg de β -carotène dissoute dans 1 ml de chloroforme puis ajoutée à un volume de 25 μ l d'acide linoléique et de 200 μ l de Tween 40, en donnant un mélange émulsifiant. Après l'évaporation sous vide du chloroforme, 50 ml d'eau distillée saturée en oxygène, sont ajoutés sous agitation vigoureuse. L'absorbance de la solution est ajustée entre 0,8 et 0,9 nm. 160 μ l de cette solution sont ajoutés à 40 μ l de solution d'extrait à différentes concentrations. L'absorbance a été mesurée à 470 nm à l'aide d'un lecteur microplaques à 96 puits. Le système d'émulsion a été incubé pendant 2 h à 50 °C, un blanc dépourvu de β -carotène, a été préparé pour la soustraction de fond. BHA et BHT ont été utilisés comme standards. Le taux de blanchissement de β -carotène (**R**) était calculé selon l'équation suivante : $R = \ln(a/b)/t$

- ln : log népérien

- a : l'absorbance au temps 0
- b : l'absorbance au temps t (120 mn)

L'activité antioxydante (AA) a été calculée en termes de pourcentage d'inhibition relatif au contrôle utilisant l'équation suivante :

$$AA \% = \frac{Abs\ controle - Abs\ Extrait}{Abs\ controle} \times 100$$

1.4.5. L'activité de piégeage des radicaux superoxydes

L'activité de piégeage des radicaux superoxydes par DMSO alcalin est déterminée par la méthode de (Rao et Kunchandy, 1990). La réduction du NBT par le superoxyde a été déterminée en présence et en l'absence d'extraits. Au mélange réactionnel contenant du 30 μ l NBT (1 mg/ml dans de l'eau distillée) et 40 μ l d'extrait à diverses dilutions ont été ajoutés à 130 μ l de DMSO alcalin (20 mg de NaOH est dissoute dans 1 ml de DMSO et compléter par le DMSO à 100 ml) pour donner un volume final de 200 μ l et l'absorbance a été mesurée à 560 nm en utilisant un lecteur microplaque.

La diminution de l'absorbance à 560 nm avec des antioxydants, indique la consommation de superoxyde généré, et le pourcentage de balayage a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$Inhibition \% = \frac{Abs\ Extrait - Abs\ Controle}{Abs\ Extrait} \times 100$$

1.4.6. Dosage du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur de l'extrait a été déterminé (Bouratoua *et al.*, 2017). Afin de déterminer l'activité du pouvoir réducteur, 10 μ l d'extrait dilué en série ont été ajoutés dans une microplaque. Après cela, 40 μ l de tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 50 μ l de potassium ferricyanide (1%) ont été ajoutés à chaque puits et la plaque a été incubée à 50 °C pendant 20 min. Enfin, 50 μ l de TCA (10%) et d'eau distillée (40 μ l) et 10 μ l de FeCl₃ (0,1%) ont été ajoutés dans chaque puits afin de mesurer l'activité du pouvoir réducteur. Ensuite, l'absorbance a été mesurée à 700 nm. Une absorbance plus élevée du mélange réactionnel a montré un pouvoir réducteur supérieur.

1.5. Évaluation *in vitro* de la propriété neuroprotectrice de l'extrait *n*-butanol de *C. maroccana*

1.5.1. Activité d'inhibition de la peroxydation lipidique

Le nitroprussiate de sodium par la libération de cyanure et / ou d'oxyde nitrique (NO) (Bates *et al.*, 1991) pourrait conduire à la formation de radicaux hydroxyles (OH) (Graf *et*

al., 1984) qui induisaient la peroxydation des acides gras insaturés dans la membrane bicouche lipidique dans les homogénats du cerveau des souris. Pour évaluer l'effet d'inhibition LPO de BECM, les cerveaux ont été obtenus à partir des rats *Wistar albinos*, disséqués et homogénéisés avec un polytron dans un tampon Tris – HCl glacé (20 mM, pH 7, 4,1: 10 w/v) pour produire un tissu cérébral homogénat (100 mg/ml) et centrifugé (15 000 × g pendant 10 min). Le surnageant (100 µl) a été incubé avec 50 µl d'un oxydant fraîchement préparé (nitroprussiate de sodium, 5 µM) et différentes concentrations de BECM, une eau distillée a été ajoutée pour atteindre un volume total de 300 µl à 37 ° C pendant 1 h.

Des réactions colorées ont été obtenues en ajoutant 200 et 500 µL de SDS à 8,1% chacun, (200 µl), d'acide acétique (500 µL; pH 3,4) et 0,6% de TBA (0,38 ml), puis le mélange a été chauffé à 80 °C pendant 20 min. Après centrifugation à 3000 tr/min pendant 10 min, le complexe malondialdéhyde (MDA) -TBA dans le surnageant a été mesuré par son absorbance à 532 nm. Le rapport d'inhibition (%) a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = (1 - \text{Absorbance de l'échantillon} / \text{Absorbance du contrôle}) \times 100.$$

1.5.2. L'activité d'inhibition de l'acétylcholine estérase

L'activité de l'acétylcholine estérase (AChE) a été mesurée sur la base de la méthode de *(Ellman et al., 1961)*, adaptée pour une détermination sur microplaque. Le test est basé sur l'hydrolyse de l'ATCI par l'enzyme et la formation d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate suivie d'un complexe avec DTNB pour donner un composé de couleur jaune qui est détecté avec un spectrophotomètre à côté du temps de la réaction. En bref, pour chaque point des données de test, 50 µl de DTNB 3 mM, 50 µl d'homogénat (préparés à 10% (p/v) selon *(Carter et al., 2007)* et *(Tarhoni et al., 2011)*, 35 µl de 50 mM Tris / HCl pH 8,0 et 40 µl des différentes concentrations d'extrait de plante ont été mélangés et incubés à 37 °C. Le test a été initié par l'ajout de 25 µl de 15 mM (ATCI), avec production de 5-thio- 2- Anion nitrobenzoate lu à 412 nm toutes les 30 s pendant 10 min à l'aide d'un lecteur microplaque. Le chlorhydrate de donépézil a été utilisé comme contrôle positif pour l'activité d'inhibition de l'AChE et le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = (1 - \text{Absorbance de l'échantillon} / \text{Absorbance du contrôle}) \times 100.$$

1.6. Détermination de l'activité antiproliférative *in vitro* de l'extrait *n*-butanol de *C. maroccana*

L'activité antiproliférative de l'extrait *n*-butanol a été évaluée sur des lignées cellulaires C6 (*Rattus norvegicus* brain glioma) et HT29 (*Homo sapiens* colorectal adenocarcinoma). Cette activité a été évaluée par le dosage de la sulforhodamine B (SRB) dans le laboratoire de la biologie moléculaire et de génétique, Université Tokat Gaziosmanpasa, Turquie.

1.6.1. Culture des cellules

Des lignées cellulaires C6 (*Rattus norvegicus* brain glioma) et HT29 (*Homo sapiens* colorectal adenocarcinoma) ont été cultivées dans du DMEM (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Tous les milieux ont été complétés avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS) et 1% de Pen/Strep. Les cellules ont été cultivées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂. L'extrait a été dissous dans de l'eau bidistillée et les solutions mères ont été filtrées en utilisant des filtres à seringue de 0,45 µm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Allemagne) et elles ont été conservées à 4°C pour une utilisation ultérieure et diluées aux concentrations souhaitées dans un milieu avant le traitement.

1.6.2. Test de cytotoxicité

Le dosage de la sulforhodamine B (SRB) a été utilisé pour déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire des lignées cellulaires (C6, HT29) traitées avec diverses concentrations d'extrait *n*-butanol comme décrit dans la méthode de [\(Vichai et Kirtikara, 2006\)](#). En bref, 7500 cellules ont étéensemencées par puits dans une plaque à 96 puits (fond plat).

Après 24 h d'incubation, les cellules ont été traitées avec diverses concentrations de l'extrait et incubées pendant 72 h. Ensuite, les cellules ont été fixées avec de l'acide trichloroacétique à 10% (TCA) pendant 1,5 heure à 4 °C et lavées 4 fois avec ddH₂O. 0,4% de colorant SRB (dissous dans 1% d'acide acétique) a été ajouté à chaque puit dans l'obscurité et les plaques ont été incubées pendant 30 minutes supplémentaires à température ambiante. Après lavage, les plaques ont été séchées et le colorant a été solubilisé en incubant les cellules avec une solution de base Tris 10 mM pendant 15 minutes sur un agitateur. Ensuite, une lecture spectrophotométrique a été effectuée à 565 nm avec un lecteur de microplaques Multiskan FC (Thermo Scientific, MA, USA) et des valeurs de DO ont été utilisées pour l'analyse.

2. Etude *in vivo*

2.1. Évaluation de l'activité neuroprotectrice de l'extrait *n*-butanol de *C. maroccana* contre la neurotoxicité induite par le cisplatine

Les animaux utilisés dans cette étude sont des souris mâle de souche *Wistar Albinos* pesant (2 ± 30 g) émanant de l'animalerie de l'institut de Pharmacie, Constantine. Ils ont été placés aléatoirement dans des cages standards pour une période d'acclimatation de deux semaines avant d'être soumis à l'étude. Pendant cette période les animaux nourris *ad libitum* et ils sont maintenus dans une animalerie à une température constante (2 ± 22) C° et soumis à un cycle de lumière /obscurité de 12/12h.

2.1.1. Induction et traitement de la neurotoxicité des souris

Pour provoquer une telle neurotoxicité, les souris ont reçu par voie intra péritonéale (Ip) une dose de cisplatine (cis- dichlorodiammine- platine II, CP) Mylon 1mg/ml (obtenu du centre anti cancéreux de Constantine). Pour évaluer les effets neuroprotecteurs du BECM contre la neurotoxicité induite par le CP.

Vingt- quatre souris divisées en quatre lots (6 souris dans chaque lot):

Lot témoins: reçoivent par gavage 1ml d'eau physiologique (NaCl 0.9 %) pendant 10 jours.

Lot CP: reçoit par voie orale 1ml de l'eau physiologique (NaCl 0.9 %) pendant 10 jours, au dernier jour, une heure après le gavage, une dose unique (8mg/kg) de CP (Aydin *et al.*, 2016) a été injectée par voie intra péritonéale.

Lot Vit E- CP: reçoit par voie orale 100mg/kg de la vitamine E (Stojiljkovic *et al.*, 2018), pendant 10 jours, au dernier jour, une heure après le gavage, une dose unique (8mg/kg) de CP a été injectée par voie intra péritonéale.

Lot EXT- CP: reçoit par voie orale 200 mg/kg de BECM pendant 10 jours, au dernier jour, une heure après le gavage, une dose unique (8mg/kg) de CP a été injectée par voie intra péritonéale.

2.1.2. Le sacrifice et la dissection des souris

Tous les lots ont été sacrifiés au 11^{ème} jour par décapitation après 18 heures d'induction par le CP, après la dissection les fragments du cerveau ont été récupérés pour la préparation des fractions cytosoliques et mitochondriales et conservés à -80 C° ont été utilisées pour le dosage des paramètres du stress oxydatif et deux tests biochimiques.

2.1.3. Préparation de la fraction cytosolique et mitochondriale

Les fragments des cerveaux récupérés après la dissection, rincés avec l'eau physiologique puis homogénéisés dans 3ml de solution tampon Tris- EDTA (0.1mM, PH 7.6)

contenant du KCl (1.15%) puis destiné après centrifugation (1000 tours/min pendant 10 min à 4 °C) au dosage du MDA.

***Préparation de la fraction cytosolique**

Le surnageant collecté est centrifugé une deuxième fois à 9600 tours/min pendant 45 min à 4 °C en vue d'obtenir la fraction cytosolique qui est destinée au dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT), superoxyde dismutase (SOD), glutathion -S- transférase (GST), glutathion peroxydase (GP_x) et glutathion réduit (GSH).

***Préparation de la fraction mitochondriale**

L'isolement des mitochondries cérébrales a été effectué à 4°C en utilisant une procédure standard basée sur une centrifugation différentielle (**Johnson et Lardy, 1967**). Brièvement les fragments des cerveaux ont été rapidement immergés dans un tampon d'isolement glacé (mannitol 220 mmol/l, saccharose 70 mmol/l, acide morpholinopropane sulfonique 5 mmol/l, pH 7,4). Les tissus hachés ont été homogénéisés dans des milieux d'homogénéisation supplémentaires (tampon d'isolement plus EGTA 2 mmol / l) 10 volumes dans un homogénéisateur Potter Elvehjem à l'aide d'un pilon en Téflon lâche (quatre coups). L'homogénat a ensuite été centrifugé pendant 10 min à 700 x g. Le surnageant a été recueilli et centrifugé à nouveau pendant 10 min à 10 000 x g à 4 °C. Le surnageant a été utilisé ensuite pour l'estimation de l'activité de la LDH et le culot a été remis en suspension dans un tampon d'isolement et centrifugé deux fois pendant 10 min à 7000 x g (le cycle de lavage a été répété trois fois pour une purification supplémentaire des mitochondries). Ensuite le culot a été mis en suspension dans le tampon. La fraction mitochondriale cérébrale a été utilisée pour l'estimation du stress oxydatif.

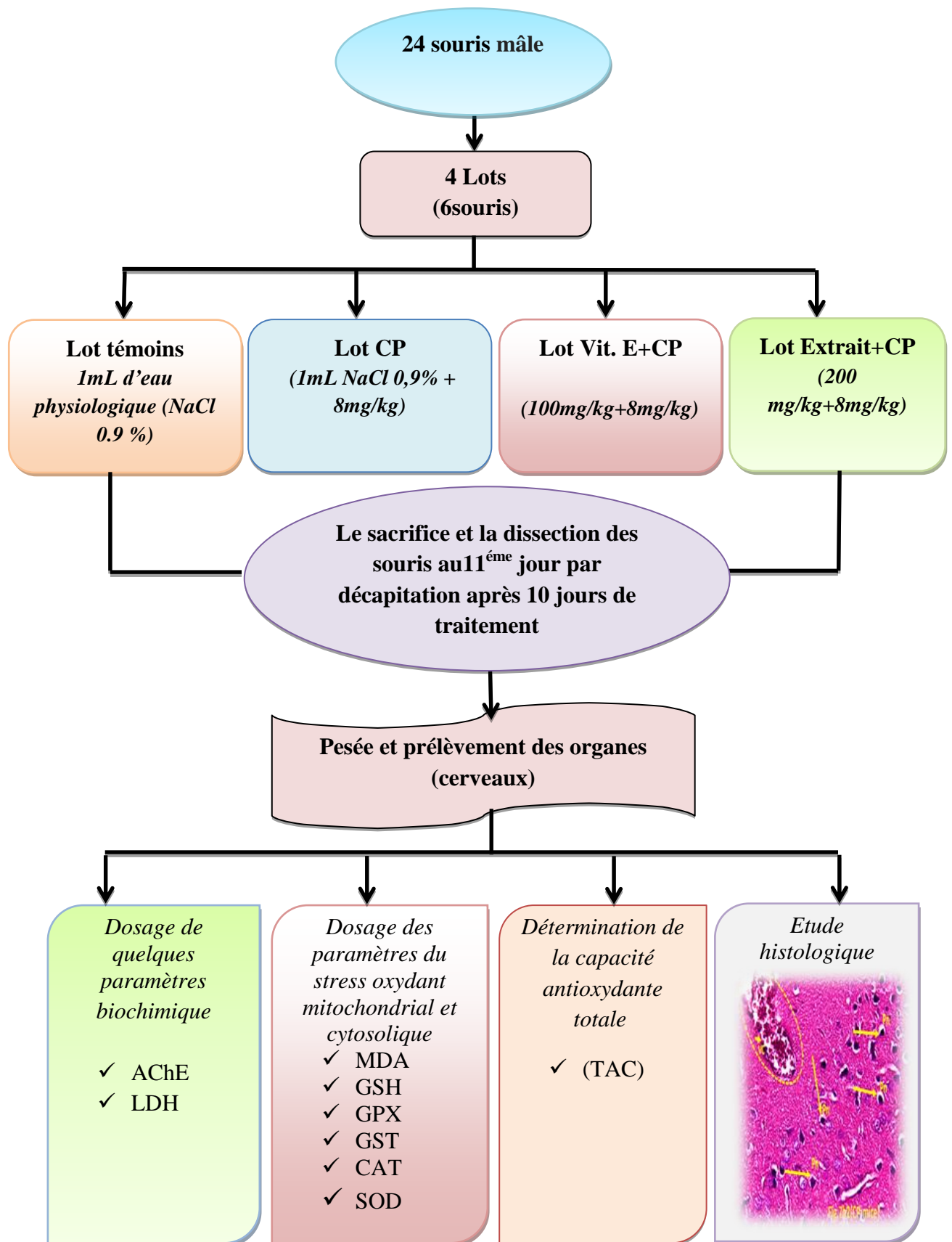


Figure 24 : Les différentes étapes du protocole expérimental.

2.2. Dosages biochimiques

2.2.1. Dosage du lactate déshydrogénase

Les lactates déshydrogénases (LDH) sont des isoenzymes cyto- plasmiques présentes dans tous les tissus catalysant la transformation réversible du lactate - pyruvate. L'activité de la LDH dans le tissu cérébral a été évaluée ([Kornberg, 1955](#)). Le substrat utilisé était du pyruvate de sodium, le pH du tampon a été maintenu à 7,5 à 37 ° C. En présence de l'enzyme, l'acide pyruvique est transformé en acide lactique. De plus, l'acide pyruvique réagit avec la 2,4-dinitrophényl hydrazine et forme une hydrazone brune intensément colorée, qui a une absorbance élevée à 400-500 nm. L'activité LDH a été exprimée en U/g de tissu.

2.2.2. Dosage de l'activité de l'acétylcholine estérase

L'activité AChE a été déterminée dans le cerveau des souris selon la méthode de ([Ellman *et al.*, 1961](#)) comme décrite ci-dessus, (sans ajouter l'extrait de plante). L'activité AChE a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire du chromophore ($1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et les résultats ont été exprimés en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine.

2.3. Détermination du statut oxydatif

Le statut oxydatif a été estimé au niveau de la fraction cytosolique et mitochondriale.

2.3.1. La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique a été évaluée en dosant le taux du (MDA) ([Ohkawa *et al.*, 1979](#)). Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux de l'oxydation des acides gras polyinsaturés par les radicaux libres libérés au cours du stress oxydant. En milieu acide et à chaud (100C°), une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique acide (TBA) pour former un complexe coloré en rose ayant une absorbance maximale à 532 nm suivant la réaction :

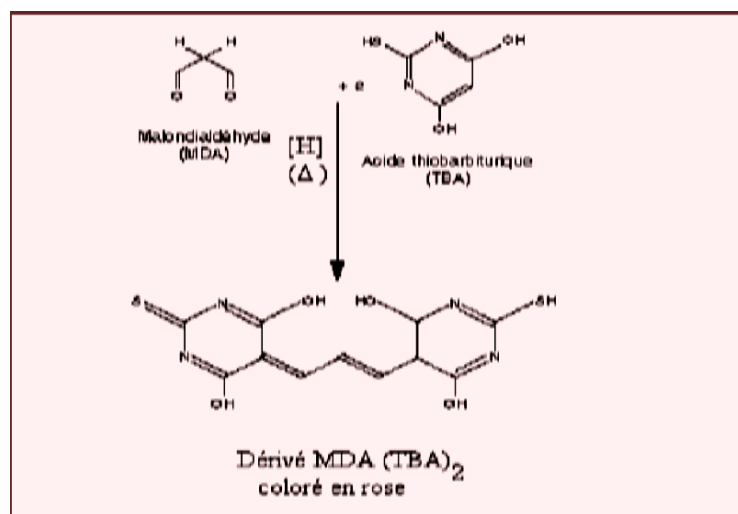


Figure 25 : Principe de dosage du Malondialdéhyde.

L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 532 nm et les résultats sont exprimés en nmol/mg de protéine (nmol/mg protéine) en utilisant le coefficient d'extinction molaire $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

2.3.2. Dosage du glutathion réduit

L'estimation des concentrations du glutathion réduit (GSH) a été réalisée d'après (Sedlak et Hanus, 1982). Le principe consiste à scinder la molécule d'acide 5.5'dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH et la libération d'un complexe de couleur jaune (l'acide thionitrobenzoïque TNB), ce dernier à PH (8-9) présente une absorbance maximale à 412 nm. Les concentrations sont exprimées en nmol de GSH/mg de protéine selon la réaction suivante :

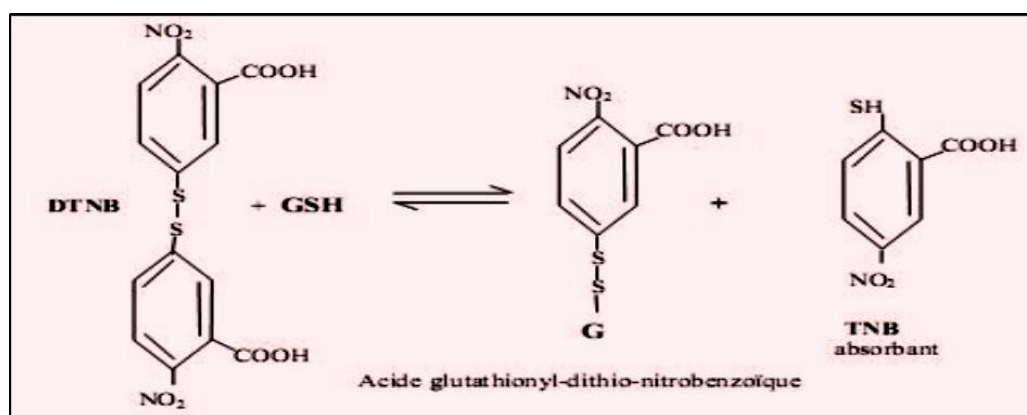
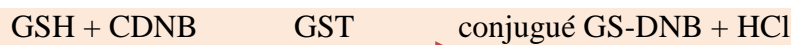


Figure 26 : Principe du dosage de glutathion.

2.3.3. Dosage de la glutathion-S- transférase

Le dosage de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) a été réalisé d'après (Habig et al., 1974). La GST catalyse la réaction de conjugaison entre le glutathion et le 1- chloro-2.4 dinitrobenzen (CDNB) comme substrat. La conjugaison se fait par le biais du groupement thiol du glutathion comme le montre la réaction suivante :



L'augmentation de l'absorption est proportionnelle à l'activité de la GST de l'échantillon, cette dernière est déterminée par la mesure du produit (GSH-DNB) à 340 nm pendant 3 min issu de la réaction de conjugaison du CDNB avec le glutathion réduit. Les résultats sont déduits en utilisant un coefficient d'extinction molaire de CDNB : $9.6 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ et exprimés en U/mg de protéine (U: μmol de conjugué CDNB formé/min).

2.3.4. Dosage de la glutathion peroxydase

Le dosage de la glutathion peroxydase (GP_X) a été effectué d'après (Rotruck et al., 1973). La GP_X de l'homogénat tissulaire oxyde le glutathion, et simultanément le H_2O_2 est réduit en

2H₂O. La quantité de glutathion restante réagit avec la solution DTNB pour donner un composé coloré qui est mesuré par spectrophotométrie à 420 nm. L'activité du GP_X est exprimée en U/mg de protéine (U: nmol de GSH oxydé/min).

2.3.5. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité de la catalase a été calculée suivant (Aebi, 1984). Le principe repose sur la disparition du H₂O₂ à 25C° en présence de source enzymatique dans la fraction cytosolique comme le montre la réaction suivante :



La quantité de H₂O₂ décomposée est proportionnelle à la concentration en substrat et la concentration en enzyme. L'absorbance est lue à 240 nm chaque minute dans un intervalle de temps de 2 min et les résultats sont exprimés en U/mg de protéine (U: μmol de H₂O₂ consommé/ min).

2.3.6. Dosage de la superoxyde dismutase

L'activité enzymatique de la SOD a été estimée conformément à (Marklund et Marklund, 1974) son principe repose sur la capacité d'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol par la SOD.

L'activité de l'enzyme est exprimée en U/mg de protéine du tissu. Une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'enzyme qui causerait l'inhibition de 50% de l'auto-oxydation du pyrogallol. L'activité de l'enzyme est calculée comme suit.

$$\text{Inhibition totale} = \frac{\text{Densité optique du blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon}}{\text{Densité optique du blanc}} \times 100$$

$$\text{L'Unité de SOD/mg de protéine} = \frac{\text{inhibition totale}}{n \times 50}$$

n : mg de protéines en mg présentes dans le volume de l'échantillon utilisé.

L'estimation des protéines dans le tissu cérébral a été analysée par la méthode de (Lowry et al., 1951) en utilisant la sérum albumine bovine comme standard.

2.4. Détermination de la capacité antioxydante totale

Le statut antioxydant total dans le tissu cérébral a été évalué selon le kit de test (T-AOC). Les analyses de la capacité antioxydante totale peuvent être largement classées en analyses basées sur le transfert d'électrons et sur le transfert d'atomes d'hydrogène (Koracevic et al., 2001). Le tissu cérébral a été homogénéisé mécaniquement dans un bain d'eau glacée

(solution saline normale; 1: 9) puis centrifugé à 1000 x g pendant 5 min à 4 °C, le surnageant collecté a été utilisé pour la mesure de la capacité antioxydante à l'aide d'un lecteur des microplaques (414 nm). Trolox qui est un analogue de la Vit. E a été utilisé comme référence et les résultats ont été exprimés en nmol trolox Equivalent / mg de protéine.

2.5. Etude histologique

Des petits fragments de cerveaux ont été fixés dans le formol à 10% et ont été traités par une méthode standard. Les échantillons ont été sectionnés par un microtome (coupes de 5 µm d'épaisseur), suivis d'une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). A partir de coupes préparées histologiquement, le nombre de cellules neuronales endommagées a été obtenu comme une moyenne de 10 champs choisis au hasard de quatre coupes par cerveau. Les modifications histopathologiques ont été classées selon un score semi-quantitatif décrit précédemment ([Meyerholz et Beck, 2019](#)). La notation microscopique des coupes cérébrales a été réalisée en utilisant cinq paramètres noyaux pycnotiques sombres dans les neurones, cellules pyramidales dégénératives, infiltration cellulaire, congestion vasculaire, vacuolisation des neuropiles (chacun 0–6).

2.6. Analyse statistique

Pour l'étude *in vivo* (n =6) les résultats sont exprimés comme valeurs de moyenne ± écart-type. L'évaluation statistique a été réalisée au moyen d'une analyse de variance (ANOVA) suivie du test de différence significative honnête (HSD) de Tukey utilisé comme test *post hoc* pour comparer la signification entre les groupes à $p < 0,05$ et $p < 0,01$, en utilisant le programme Open stat 2014. L'étude *in vitro* a été réalisée en triplet et les résultats exprimés en moyenne ± écart-type. Des différences significatives entre les moyennes ont été déterminées par le test *t* de Student, des valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

II. Résultats

II.1. Résultats de l'étude expérimentale *in vitro*

1. Etude phyto-chimique

1.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Les résultats dans le tableau 6, montrent que l'extrait butanolique de la plante *Centaurea maroccana* (BECM) est assez riche en polyphénols ($242,30 \pm 1,44$ μg GAE/mg d'extrait) et malgré cette richesse de cette fraction, elle ne renferme que ($23,34 \pm 1,28$ μg QE/mg d'extrait) des polyphénols sous forme de flavonoïdes.

Tableau 6 : Teneur en polyphénols totaux et des flavonoïdes d'extrait *n-BuOH* de *Centaurea maroccana*.

fraction	Teneur en polyphenols (μg GAE/mg extrait)	Teneur en flavonoides (μg QE /mg d'extrait)
BECM	$242,30 \pm 1,44$	$23,34 \pm 1,28$

1.2. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

La LC-MS/MS est une technique utilisée pour l'analyse et l'identification des composés phénoliques (Abid *et al.*, 2017). Le profil LC-MS de la fraction *n-BuOH* de *C. maroccana* est illustré dans la (figure 27). Plusieurs composés ont été décelés, seuls onze composés phénoliques qui ont été identifiés dans la phase butanolique en comparant leurs temps de rétention avec ceux des normes commerciales disponibles (tableau 7). Ces composés étaient des dérivés phénoliques des acides hydroxycinnamique, hydroxybenzoïque et des flavonoïdes, le plus abondant était l'acide férulique.

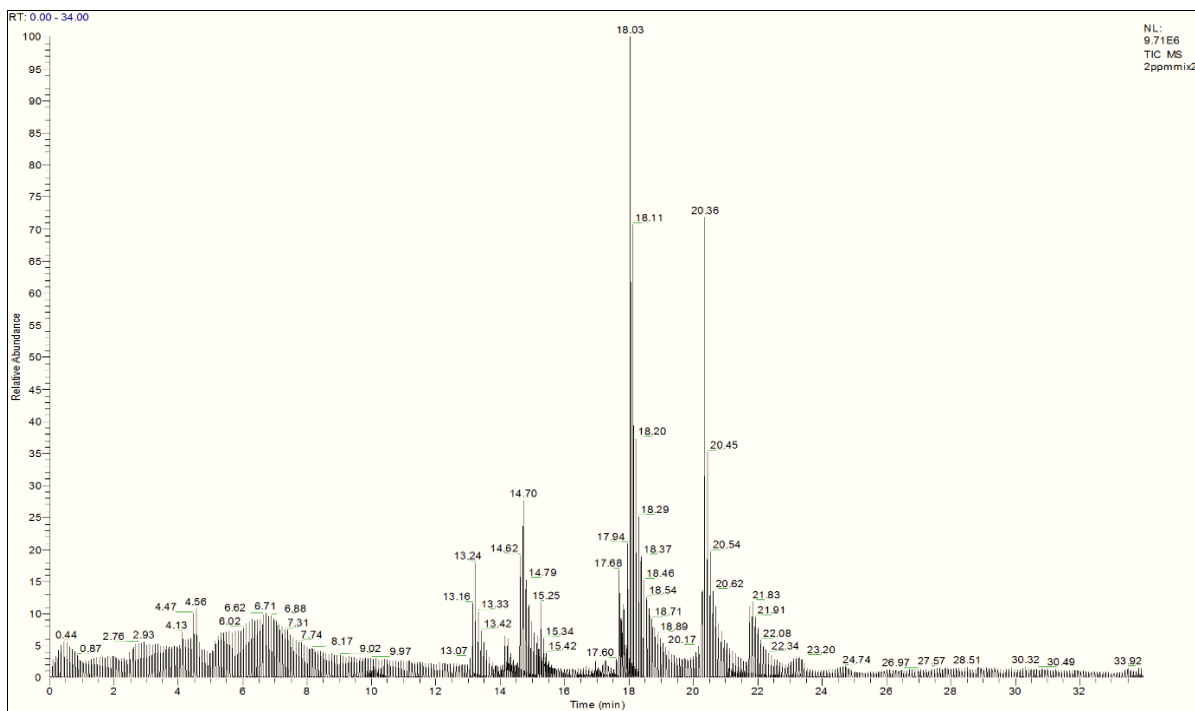


Figure 27 : Le profil LC-MS de l'extrait *n*-BuOH de *C. maroccana*.

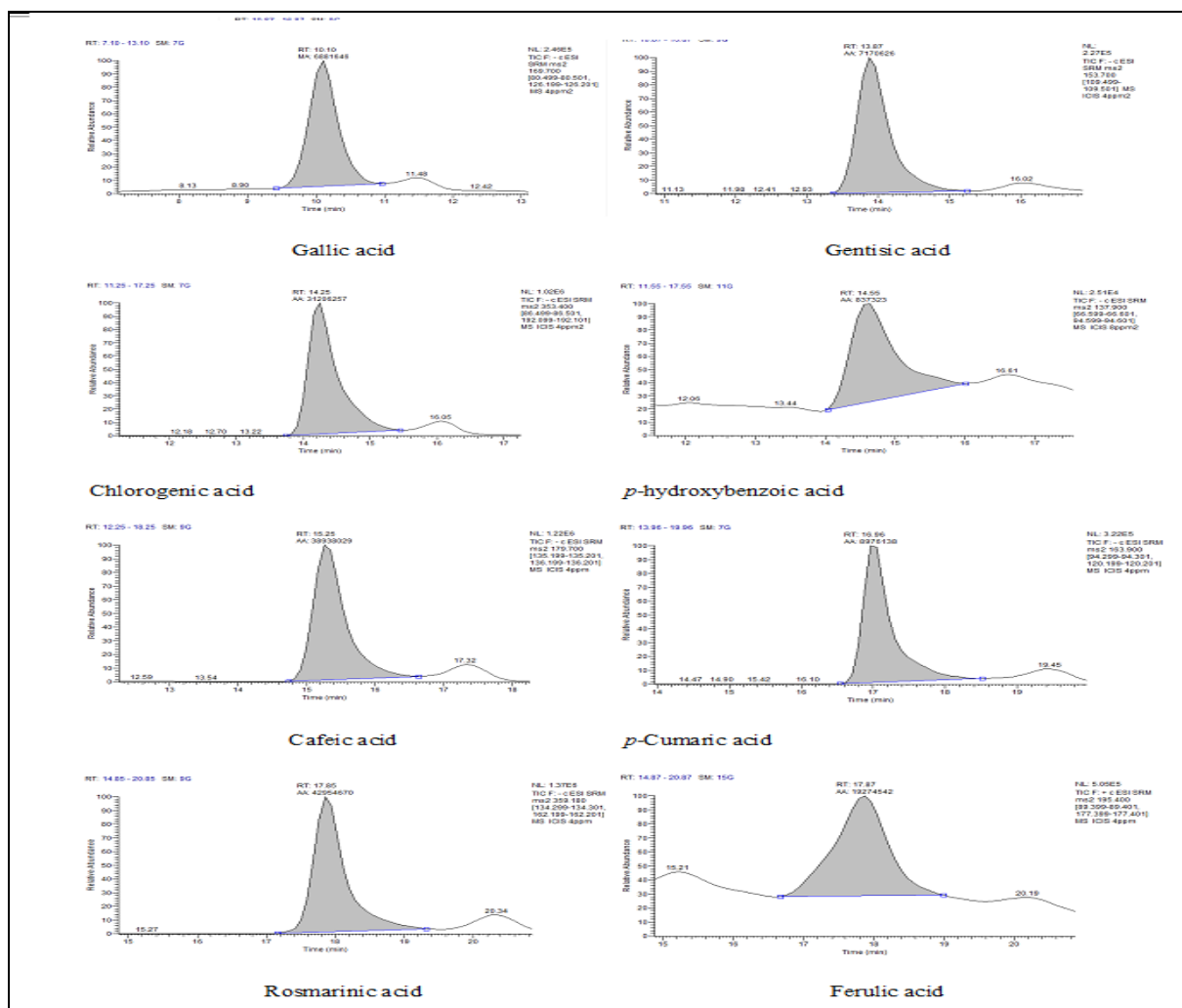


Figure 28: Chromatogramme des standards.

Tableau 7: Le profil LC-MS des composés phénoliques de l'extrait *n-BuOH* de *C. maroccana*.

N°	Nom	MS/MS Ions étudiés				LOD	LOQ	RT	mg phénol /Kg Extrait
		Parent	Produit	CE	Polarité				
1	Acide galique	169.7	80.5 126.2	25 16	- -	0.058	0.091	10.1	82.571
2	Acide gentisique	153.7	109.5	21	-	0.026	0.039	13.87	584.000
3	Acide chlorogénique	353.4	86.5 192.1	43 21	- -	0.051	0.072	14.25	31.978
4	Acide <i>p</i> -Hydroxybenzoïque	137.9	66.6 94.6	38 17	- -	0.243	0.519	14.64	746.669
5	Acide caféique	179.7	135.2 136.2	27 18	- -	0.042	0.058	15.26	394.358
6	Acide <i>p</i> -coumarique	163.9	94.3 120.2	33 17	- -	0.069	0.109	16.97	180.929
7	Acide rosmarinique	359.2	134.3 162.2	44 20	- -	0.029	0.050	17.86	69772.4 71
8	Acide férulique	195.4	89.4 177.4	30 7	+ +	0.063	0.118	17.88	140963. 099
9	Naringénine	273	147.1 153	20 24	+ +	0.052	0.068	20.46	8.554
10	Quercétine	301	152.1 179.9	23 20	- -	0.141	0.181	20.51	7.224
11	Kaempferol	287	153 165	33 28	+ +	0.188	0.447	21.92	15.618

2. L'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait *n*-butanol de *C. maroccana*.

Dans cette étude, la propriété antioxydante de BECM a été déterminée par six essais complémentaires, à savoir, le blanchissement du β -carotène, l'inhibition des radicaux DPPH[•], ABTS^{•+}, les radicaux superoxydes par DMSO alcalin, le test de réduction CUPRAC et le pouvoir réducteur. Les résultats, sauf pour le dosage CUPRAC, le pouvoir réducteur, ont été enregistrés à la concentration 50% d'inhibition (IC₅₀).

2.1. L'effet anti-radicalaire par le test au DPPH^{*}

La capacité anti-radicalaire de l'extrait butanolique de *C. maroccana* a piégé le radical DPPH^{*} (figure 29) et les standards utilisés dans ce test sont le BHT et le BHA. L'extrait et les standards ont montré une diminution significative ($p < 0,05$) de la concentration des radicaux DPPH^{*}. L'extrait testé a présenté une activité antiradicalaire plus élevée ($IC_{50}=12,09 \pm 0,54 \mu\text{g/ml}$) même supérieure à celle du standard BHT ($22,32 \pm 1,19 \mu\text{g/ml}$), tandis que IC_{50} BHA était de ($5,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$).

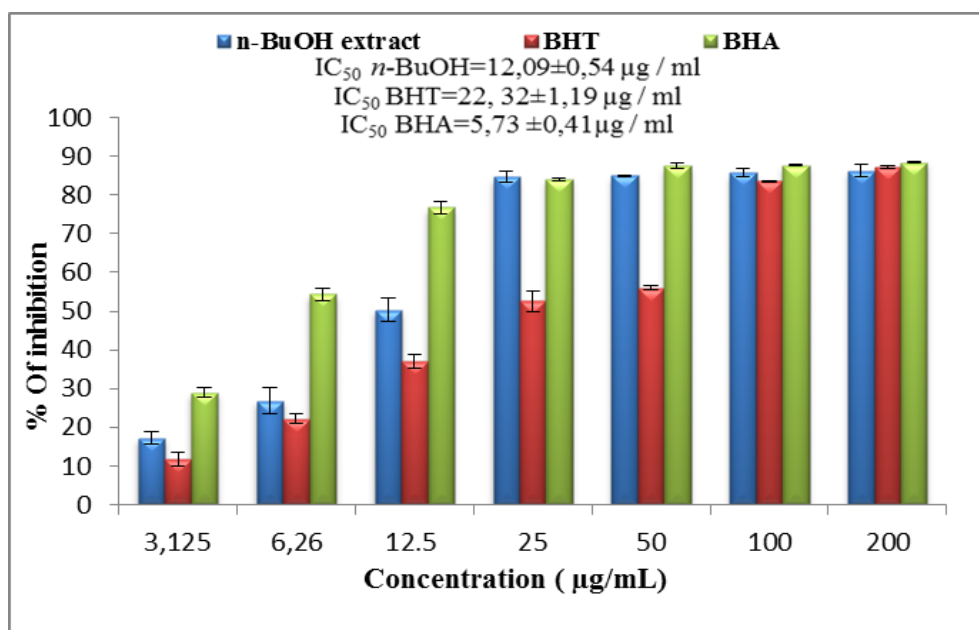


Figure 29 : L'activité antioxydante de l'extrait *n-BuOH* de *C. maroccana* à l'égard du radical DPPH^{*}. Chaque point représente la moyenne \pm SD ($n=3$).

2.2. L'activité de Piégeage du radical cation ABTS^{•+}

La (figure 30) montre que le radical cationique ABTS^{•+} a été significativement inhibé à toutes les concentrations testées. Une bonne activité antiradicalaire du cation ABTS^{•+} a été observée dans l'extrait butanolique avec ($IC_{50} = 15,13 \pm 0,87 \mu\text{g/ml}$) par rapport aux standards BHT ($IC_{50}=1,29 \pm 0,30 \mu\text{g/ml}$) et BHA ($IC_{50} = 1,81 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$).

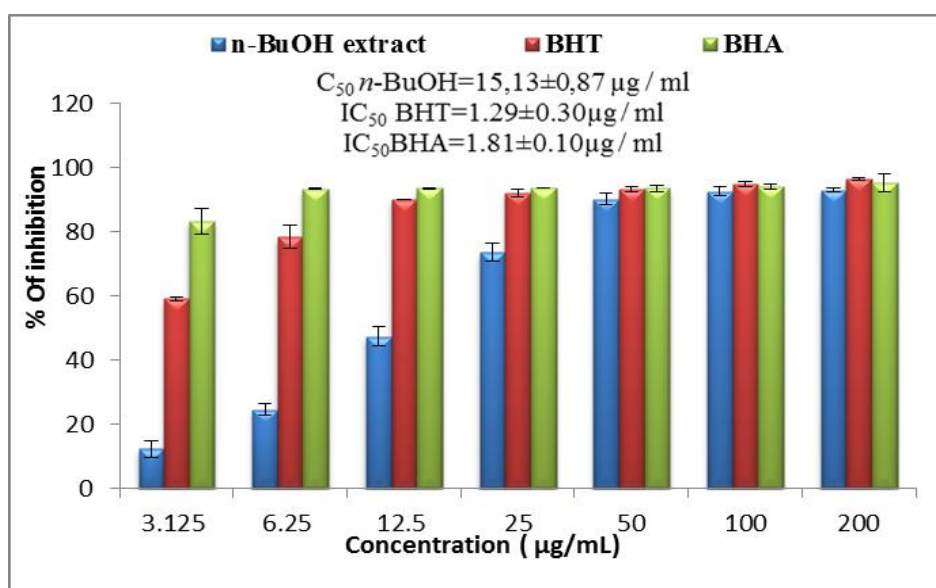


Figure 30 : L'effet scavenger d'ABTS^{•+} de l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea maroccana* et les standards BHT, BHA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3).

2.3. L'activité antioxydante (CUPRAC)

D'après les résultats (figure 31), on a remarqué que l'absorbance du radical CUPRAC augmente en fonction de la concentration de l'extrait. Une forte activité antioxydante réductrice du CUPRAC a été remarquée dans l'extrait de *C. maroccana* suivie d'une valeur $A_{0.50}$ ($A_{0.50} = 9,80 \pm 0,43 \mu\text{g/ml}$) qui est très proche de celle du BHT ($A_{0.50} = 9,62 \pm 0,87 \mu\text{g/ml}$), alors que celle de BHA ($A_{0.50} = 3,64 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$). En outre, à la concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$, la même activité réductrice a été observée dans l'extrait et le BHA ($3,48 \pm 0,13\%$; $3,93 \pm 0,01\%$) alors que le BHT était de ($2,32 \pm 0,28\%$).

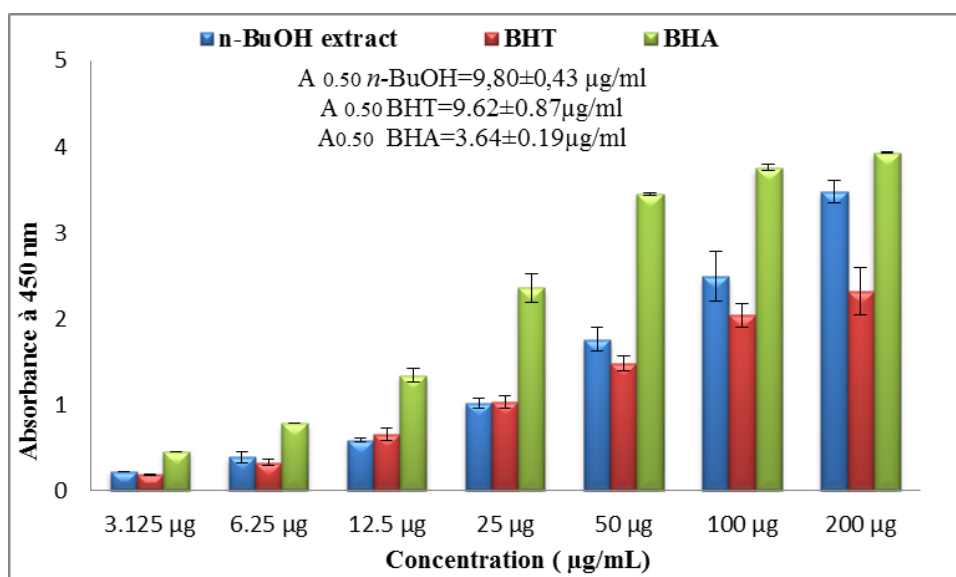


Figure 31 : Histogramme représentant le pouvoir inhibiteur de l'extrait butanolique de *C. maroccana* (CUPRAC).

2.4. L'activité de blanchissement de la β -carotène

Les résultats présentés dans l'histogramme (figure 32) ont démontré que le pouvoir d'inhibition de blanchissement du β -carotène de l'extrait *n-BuOH* augmente de manière significative ($p < 0,05$) avec l'augmentation de la concentration. En ce qui concerne l' IC_{50} , l'extrait et les standards BHT, BHA sont dans l'ordre suivant: ($11,08 \pm 0,30 \mu\text{g/ml}$; $1.05 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$; $0.90 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$), donc basés sur les valeurs IC_{50} , et on constate donc que l'extrait butanolique est moins actif que les standards.

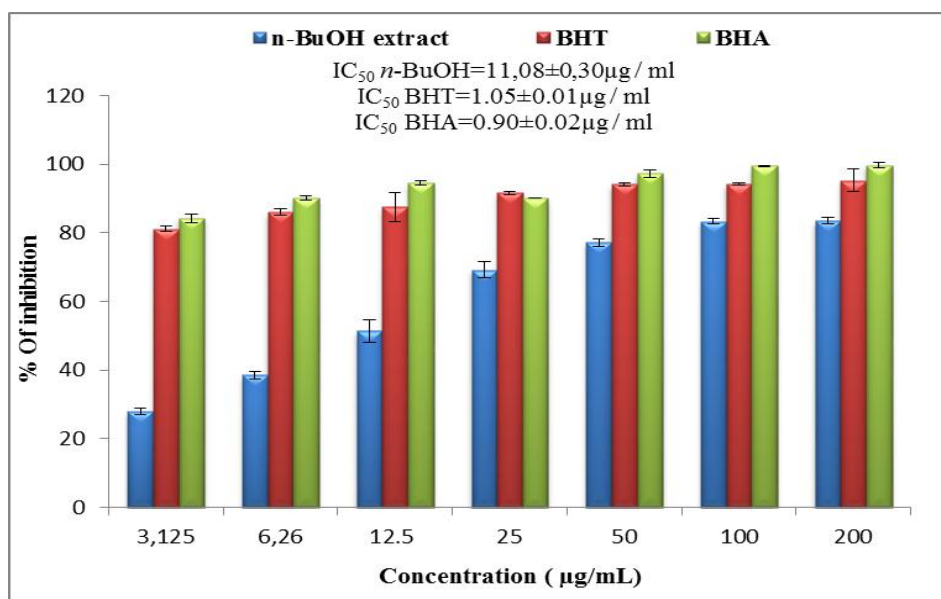


Figure 32: Histogramme représentant l'activité antioxydante de *C. maroccana* sur la β -carotène/acide linoléique. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD ($n=3$).

2.5. L'activité de neutralisation des radicaux superoxydes par le DMSO alcalin

L'histogramme (figure 33) montre que l'extrait butanolique inhibe la formation du radical anion superoxyde généré *in vitro* par le système alcalin DMSO de manière dose-dépendante. L'inhibition maximale de la réduction du NBt par le superoxyde ($91,57 \pm 0,51\%$) a été observée dans l'extrait à une concentration élevée ($200 \mu\text{g/ml}$) par rapport aux normes antioxydantes de l'acide tannique et de l' α -tocophérol ($97,54 \pm 0,68\%$, $96,86 \pm 1,53\%$) respectivement. L'extrait *n-BuOH* a manifesté une excellente activité inhibitrice des superoxydes ($IC_{50} = 4,50 \pm 0,33 \mu\text{g/ml}$) et qui est plus proche de celle des deux standards utilisés ($IC_{50} = < 3,125 \mu\text{g/ml}$ et $< 3,125 \mu\text{g/ml}$).

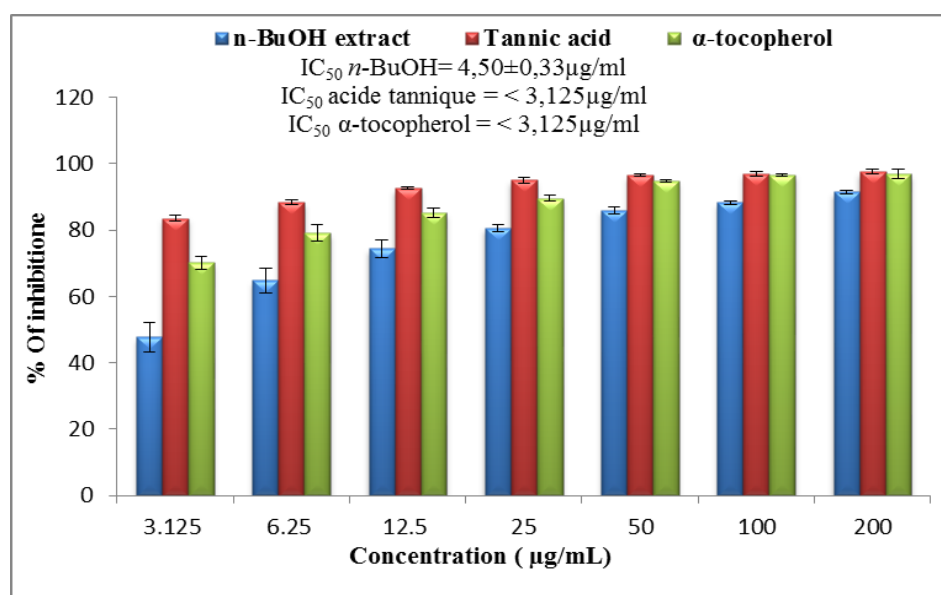


Figure 33 : Histogramme représentant le pouvoir inhibiteur de l'extrait butanolique du *C. maroccana* (DMSO).

2.6. Le pouvoir réducteur

La (figure 34) montre que l'extrait *n-BuOH* de *C. maroccana* a un pouvoir de réduire le ferricyanide ferrique en augmentant l'absorbance avec la concentration où il a présenté une absorbance de $(1,11 \pm 0,09)$ à la concentration $(50 \mu\text{g/ml})$, tandis que les standards utilisés le BHT, BHA et l'acide ascorbique ont présenté une absorbance de $(0,43 \pm 0,02)$, $(3,53 \pm 0,19)$, $(3,87 \pm 0,27)$ respectivement à la même concentration. D'où cet extrait ($A_{0,50} = 14,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$) a un pouvoir réducteur fort par rapport au BHT ($A_{0,50} = > 50$), BHA ($A_{0,50} = 8.41 \pm 0.67$), et l'acide ascorbique ($A_{0,50} = 9,01 \pm 1,46$).

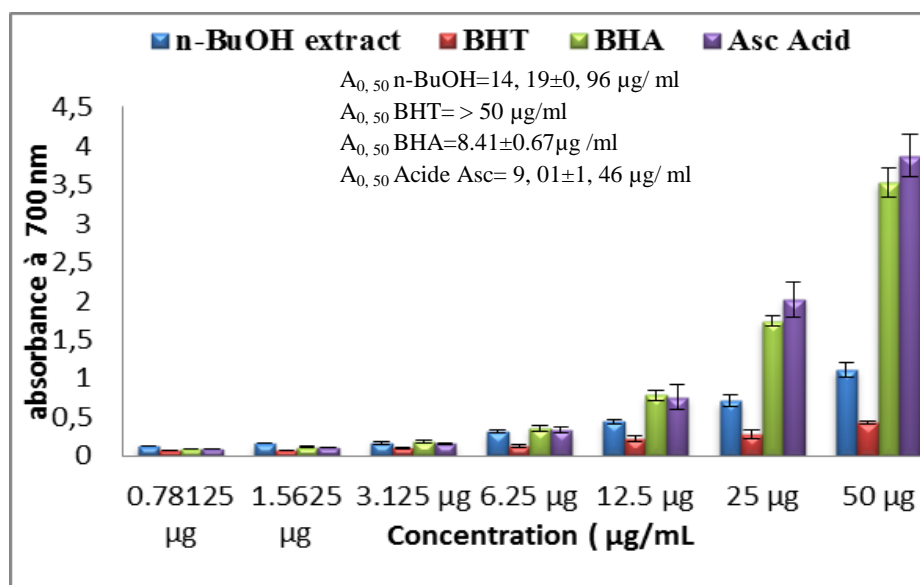


Figure 34 : Pouvoir réducteur de l'extrait *n-BuOH* de *C.maroccana* et les standards BHT, BHA, acide ascorbique. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3).

3. Propriété neuroprotectrice de l'extrait *n*-butanol de *C. maroccana*

3.1. L'activité d'inhibition de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique dans les homogénats du cerveau des souris a été induite à l'aide de nitroprussiate de sodium et l'effet antioxydant potentiel du BECM a été déterminé. Les résultats (figure 35) ont révélé que le BECM ($59,90 \pm 0,849\%$) avait une bonne protection et réduit le LPO généré à une concentration de $400 \mu\text{g/ml}$ par rapport au trolox ($82,88 \pm 1,52\%$). La valeur IC_{50} du BECM et du trolox est révélée à : $245,78 \pm 30,68 \mu\text{g/ml}$ et $69,89 \pm 2,73 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

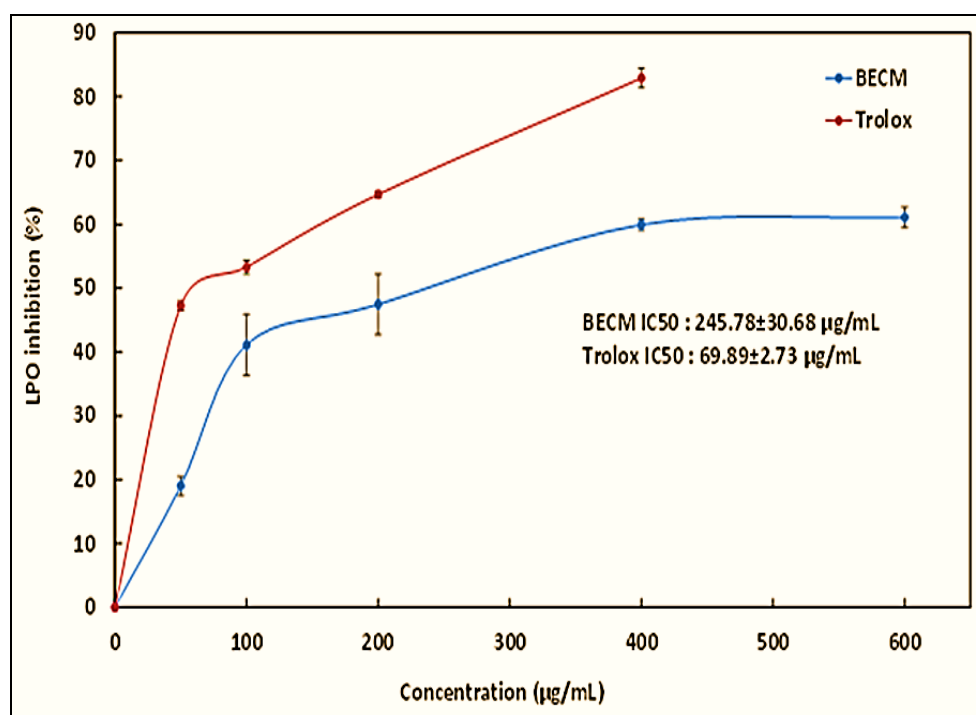


Figure 35 : L'inhibition de la peroxydation lipidique (%) du BECM et du trolox. Chaque valeur représente une moyenne \pm SD ($n = 3$), ($p < 0,01$).

3.2. L'activité inhibitrice de l'acétylcholine estérase (AChE)

Les résultats des activités inhibitrices de l'AChE du BECM ainsi que du contrôle positif, le chlorhydrate de donépézil, sont présentés dans la (figure 36). Le BECM a inhibé significativement ($p < 0,01$) l'augmentation de l'AChE d'où à la concentration de $400 \mu\text{g/ml}$ le pourcentage d'inhibition est de $73,15 \pm 1,87\%$, ce qui indique qu'il s'agit d'une bonne source d'inhibiteur cholinergique. La valeur IC_{50} du BECM s'est avérée de $186,57 \pm 5,08 \mu\text{g/ml}$, comparée au chlorhydrate de donépézil ($\text{IC}_{50} = 31,10 \pm 1,31 \mu\text{g/ml}$).

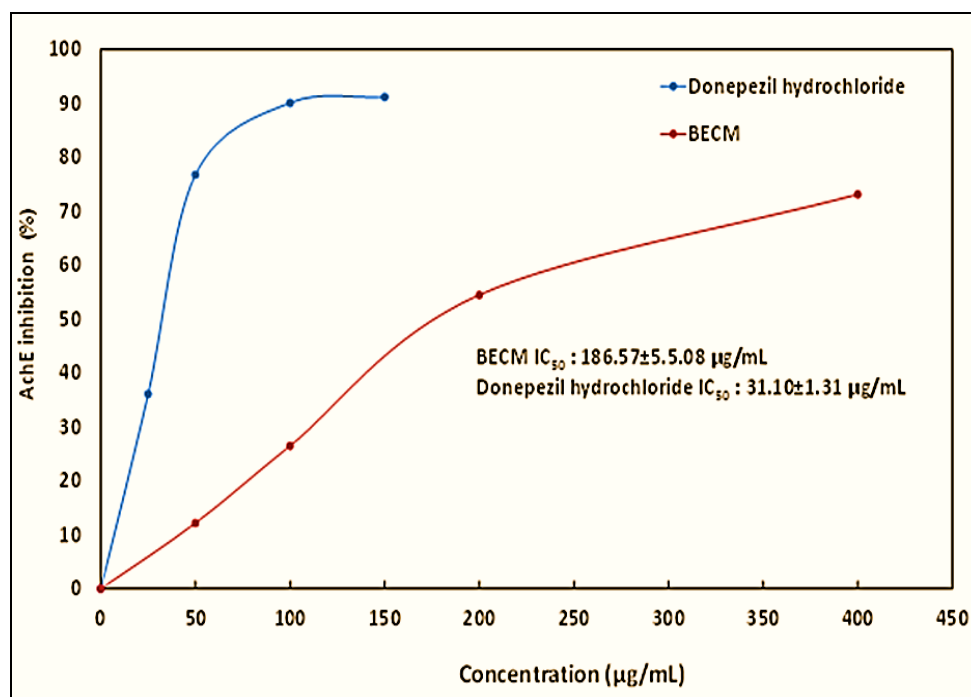


Figure 36 : Activité inhibitrice de l'AChE (%) de BECM et le contrôle positif chlorhydrate de donépézil. Chaque valeur représente une moyenne \pm SD ($n = 3$), ($P < 0,01$).

4. L'activité antiproliférative de l'extrait *n*-butanol de *C. maroccana*

Après avoir effectué un dépistage de cytotoxicité à l'aide du test SRB, la (figure 37) montre que l'extrait *n*-BuOH diminue significativement le pourcentage de la viabilité des deux lignées cellulaires cancéreuses (C6 - lignée cellulaire de gliome, HT29 - lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal) avec des concentrations croissantes la plage de 50 à 300 µg/ml.

L'effet cytotoxique du BECM était très similaire pour les deux lignées des cellules cancéreuses. À une concentration de 300 µg/ml, la viabilité cellulaire était inférieure à 50% par rapport aux cellules témoins (aucun traitement) à la fois en C6 et HT29, alors que les valeurs d' IC_{50} sont: 219,6 µg/ml et 267,3 µg/ml respectivement. Ensuite, nous avons examiné l'effet d'un traitement combiné avec BECM et le cisplatine, L'association du CP et le BECM a provoqué une légère diminution de la viabilité cellulaire par rapport au traitement par le CP uniquement pour les deux lignées cellulaires.

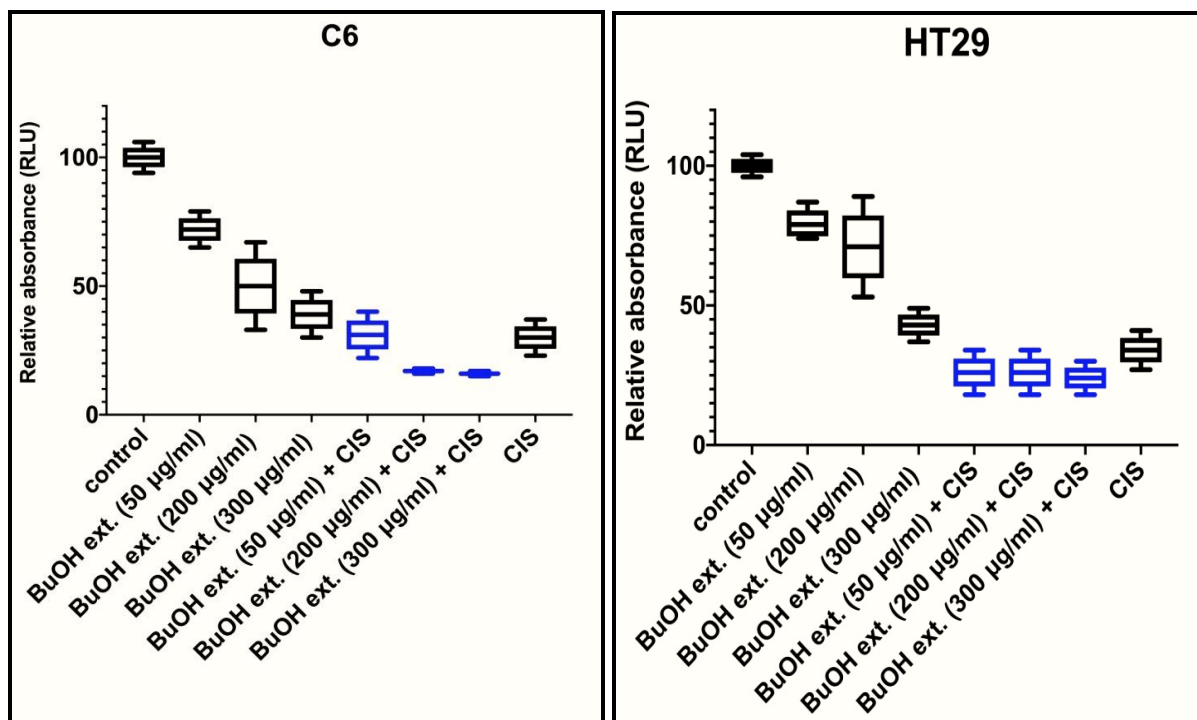


Figure 37 : Cytotoxicité de l'extrait *n*-butanol de *C. maroccana* sur des lignées cellulaires C6 et HT29.

Boxplots montrant le pourcentage de viabilité cellulaire des lignées cellulaires traitées avec des concentrations d'extrait de *n*-butanol indiquées (BuOH ext.) et /ou cisplatine. La cytotoxicité a été mesurée à l'aide du test SRB et 5 μ M de cisplatine ont été utilisés dans ces expériences. Boxplots bleus indiquent les traitements combinés avec le cisplatine.

II.2. Résultats de l'étude expérimentale *in vivo* de l'activité neuroprotectrice du BECM contre la neurotoxicité induite par le cisplatine

1. Les activités de la LDH et de l'AChE

L'administration du CP (8 mg/kg) aux souris a induit une altération cérébrale marquée, comme le témoigne l'élévation significative ($p < 0,01$) des taux d'AChE et une réduction significative ($p < 0,01$) des taux de LDH dans le tissu cérébral, par rapport au groupe témoin.

Le prétraitement des animaux par le BECM à la dose de (200 mg/kg) et la Vit. E à la dose de (100 mg/kg) pendant 10 jours a rétabli l'activité du LDH (79,55%) et a inhibé l'activité d'AChE (71,25 %) significativement ($p < 0,01$) dans le cerveau par rapport au groupe Vit. E (86,10%, 85,41%) respectivement (figure 38).

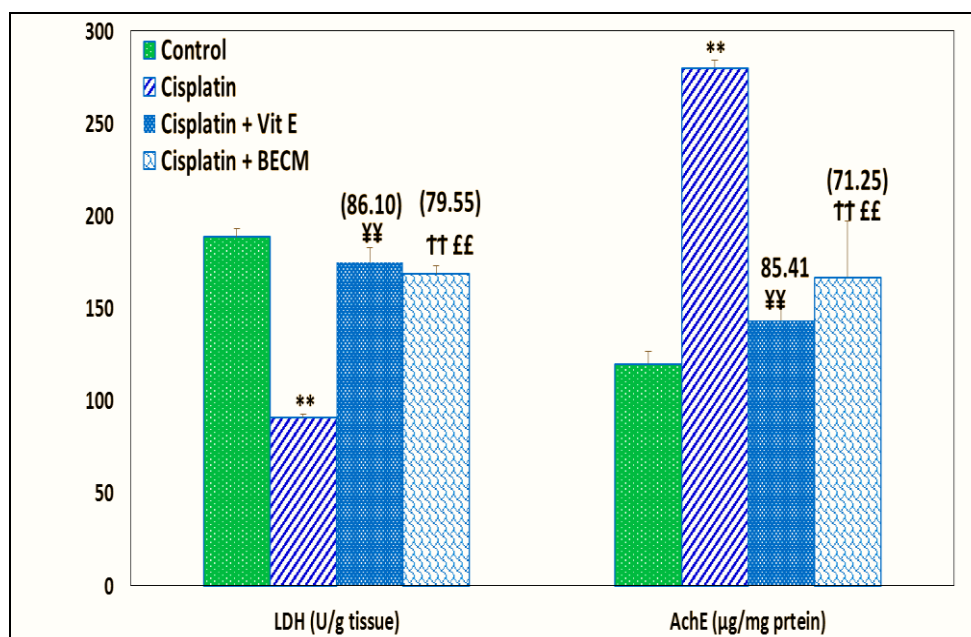


Figure 38 : L'effet de BECM (200 mg / kg) sur les niveaux d'AChE et LDH dans le cerveau chez les souris traitées par le CP (8mg/kg).

Les valeurs sont moyennes \pm SD, (n = 6), *: groupe CP vs groupe témoin; (** $p < 0,01$). ¥: groupe CP vs groupe CP + Vit. E; (¥¥ $p < 0,01$); †: groupe CP vs groupe CP + BECM († † $p < 0,01$); £: groupe CP + Vit. E vs groupe CP + BECM (££ $p < 0,01$). Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est calculé comme suit: $100 \times (\text{valeurs de CP}) - \text{valeurs d'échantillons} / (\text{valeurs de CP}) - \text{valeurs de contrôle}$.

2. Marqueurs du stress oxydant dans la fraction cytosolique du cerveau

2.1. La peroxydation lipidique

Les souris traitées avec le CP, ont développé une augmentation significative ($p < 0,01$) de la peroxydation lipidique (MDA) dans la fraction cytosolique du cerveau.

Le prétraitement des animaux par BECM à la dose de (200 mg/kg PC) et par la Vit E à la dose de (100 mg/kg; pc) a fourni une protection significative ($p < 0,01$). Les niveaux élevés de MDA sont diminués lors du traitement par le BECM, dans la fraction cytosolique (77%) du cerveau par rapport au groupe Vit E (82,5%) (figure 39a).

2.2. L'activité enzymatique de la CAT et de la SOD

L'exposition des souris à le CP a provoqué une réduction significative ($p < 0,01$) des activités des SOD et CAT.

Le prétraitement par le BECM et la Vit E a significativement inversé l'activité CAT (57,85%, 72,28%; $p < 0,01$) et a inversé les niveaux du SOD (71,42%, 84,24%; $p < 0,01$) dans la fraction cytosolique cérébrale (figure 39a).

2.3. L'activité enzymatique du système glutathion

Le traitement par le CP était également accompagné d'une déplétion significative ($p < 0,01$) du taux de GSH et d'une réduction significative ($p < 0,01$) des deux activités GPX, GST chez les souris traitées au CP par rapport aux animaux témoins.

Nos résultats ont clairement montré que le prétraitement par l'extrait *n*-BuOH du *C. maroccana* a régulé significativement ($p < 0,01$) les changements dans les niveaux d'enzyme métabolisant le glutathion dans la fraction cytosolique cérébrale. Le prétraitement par le BECM a inversé les niveaux du GSH (69,20%, $p < 0,01$) en montrant l'effet préventif comparable du BECM et de la Vit E (89,32%).

Les activités de GPx (61,89%, $p < 0,01$) et de GST (68,33%, $p < 0,01$) ont été significativement rétablies par l'administration préalable de BECM a également montré l'effet préventif comparable à la Vit E de GPx (88,4%, $p < 0,01$) et de GST (85%, $p < 0,01$) respectivement (figure 39 b).

3. Les marqueurs du stress oxydatif dans la fraction mitochondriale du cerveau

Le statut oxydant mitochondrial a été évalué au niveau des mitochondries isolées du cerveau des souris traités par l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) et le CP (8 mg/kg). Les souris traitées par le CP ont présentait une déplétion du taux de GSH mitochondrial associée à une diminution significative de l'activité des enzymes antioxydants SOD, CAT, GPx, GST et accompagnée d'une augmentation significative du taux du MDA, marqueur principal de la peroxydation lipidique.

Le prétraitement des souris par le BECM (200 mg/kg) a réduit le taux du MDA à (74, 54%) (figure 40 a), et a restauré d'une manière significative le taux du GSH à (68, 14%) (Figure 39b), et a rétabli les activités des enzymes du système antioxydant, la SOD à (67, 87%), la CAT à (63,36%), le GPx à (57, 14%), et le GST à (69,82%) (figure 40 a ;b) respectivement. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec le prétraitement des souris par la vitamine E MDA (82,72%), GSH (85, 84%), SOD (86, 28%), CAT(80, 36%), GPx (83, 52%), et GST (83, 62%) respectivement (figure 40 a, b).

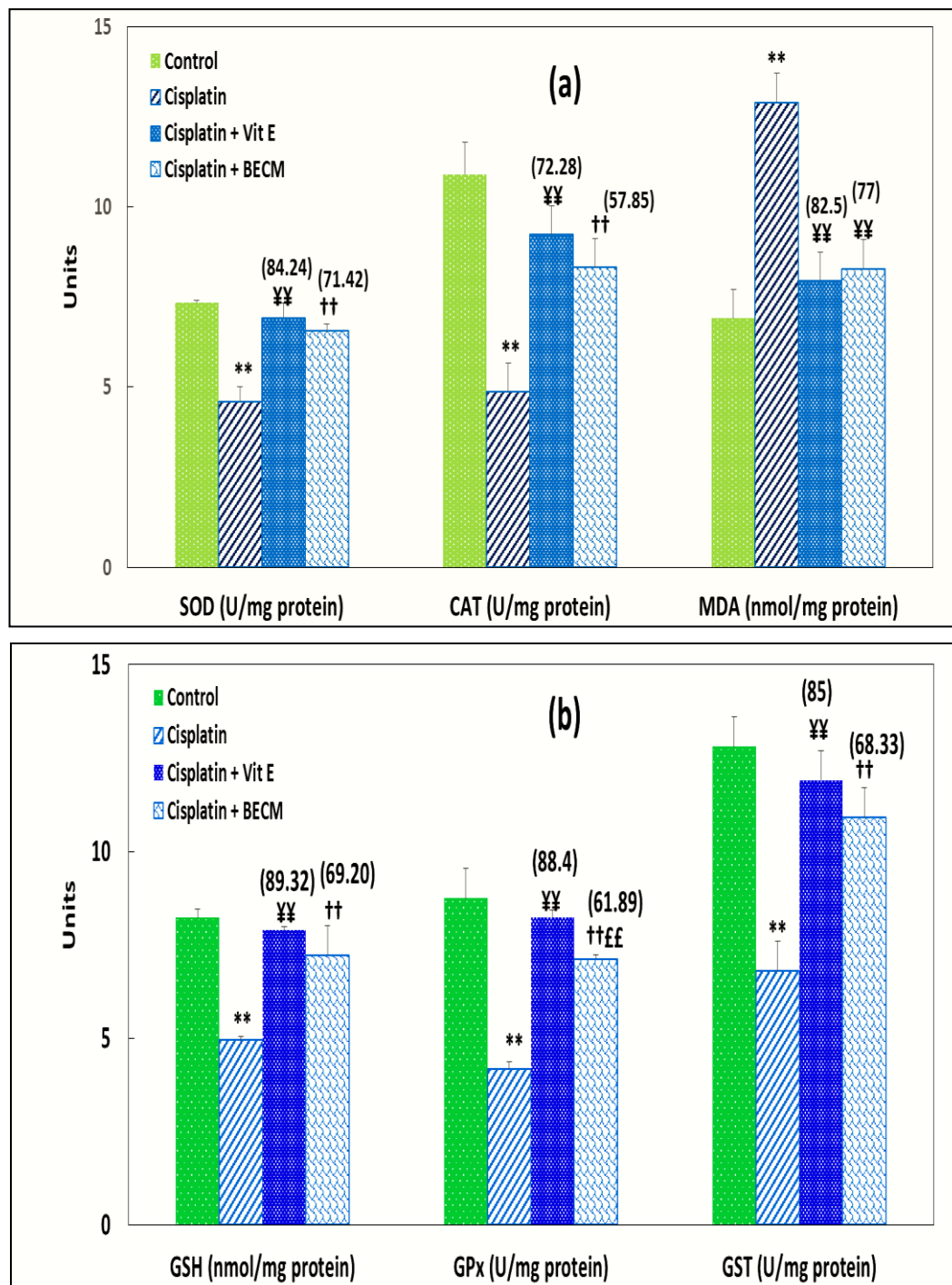


Figure 39 (a ; b) : L'effet protecteur de BECM (200 mg/kg) sur les marqueurs de stress oxydatif de la fraction cytosolique du cerveau chez des souris traités par le CP (8mg/kg).

Les valeurs sont moyennes \pm SD, (n = 6), *: groupe CP vs groupe témoin; (** p <0,01). ‡: groupe CP vs groupe CP + Vit. E; (‡‡ p <0,01); †: groupe CP vs groupe CP + BECM († † p <0,01); £: groupe CP + Vit. E vs groupe CP + BECM (££ p <0,01). Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est calculé comme suit: $100 \times (\text{valeurs de CP}) - \text{valeurs d'échantillons} / (\text{valeurs de CP}) - \text{valeurs de contrôle}$.

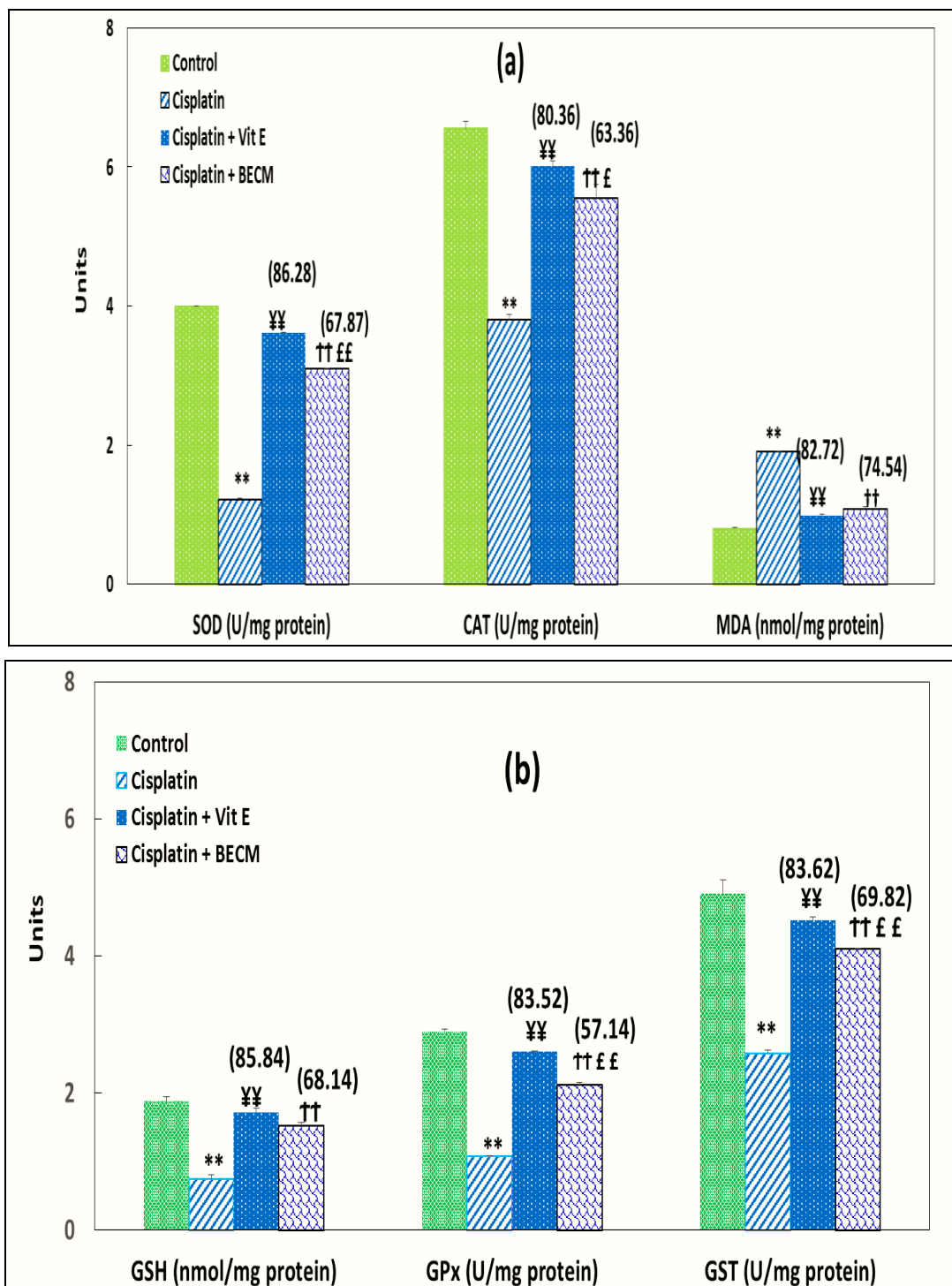


Figure 40 (a ; b) : L'effet protecteur de BECM (200 mg/kg) sur les marqueurs de stress oxydatif de la fraction mitochondriale du cerveau chez des souris traitées par le CP (8 mg/kg). Les valeurs sont moyennes \pm SD, (n = 6), *: groupe CP vs groupe témoin; (** p < 0,01). ¥: groupe CP vs groupe CP + Vit. E; (¥¥ p < 0,01); †: groupe CP vs groupe CP + BECM (†† p < 0,01); £: groupe CP + Vit. E vs groupe CP + BECM (££ p < 0,01). Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est calculé comme suit: $100 \times (\text{valeurs de CP}) - \text{valeurs de contrôle}$.

4. La capacité antioxydante totale

L'inhibition de la couleur bleu-verte du radical $ABTS^{\bullet+}$ par les antioxydants dans le BECM était proportionnelle à la concentration des antioxydants totaux.

La capacité antioxydante totale a été significativement réduite ($p < 0,01$) dans le groupe CP par rapport au groupe témoin (figure 41). Le BECM a révélé une bonne protection, comme en témoigne l'élévation significative ($p < 0,01$) des niveaux de TAC (70,66%) par rapport à la Vit.E (92,08%).

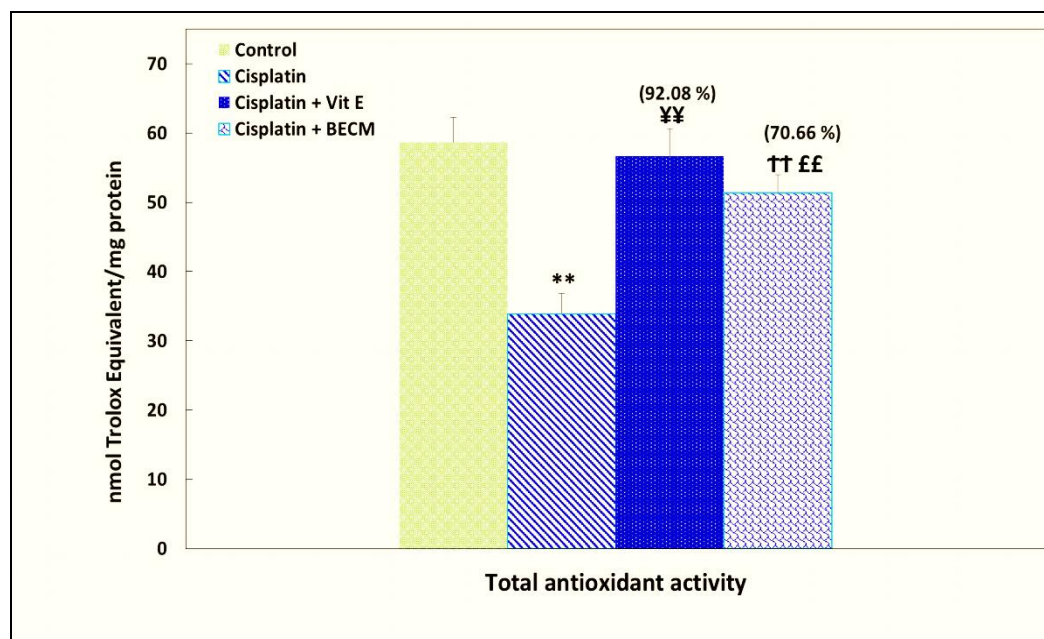
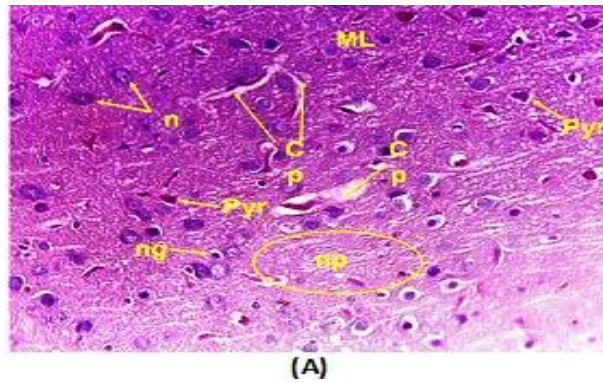


Figure 41: L'effet du BECM (200 mg/kg) sur la capacité antioxydante totale (TAC).

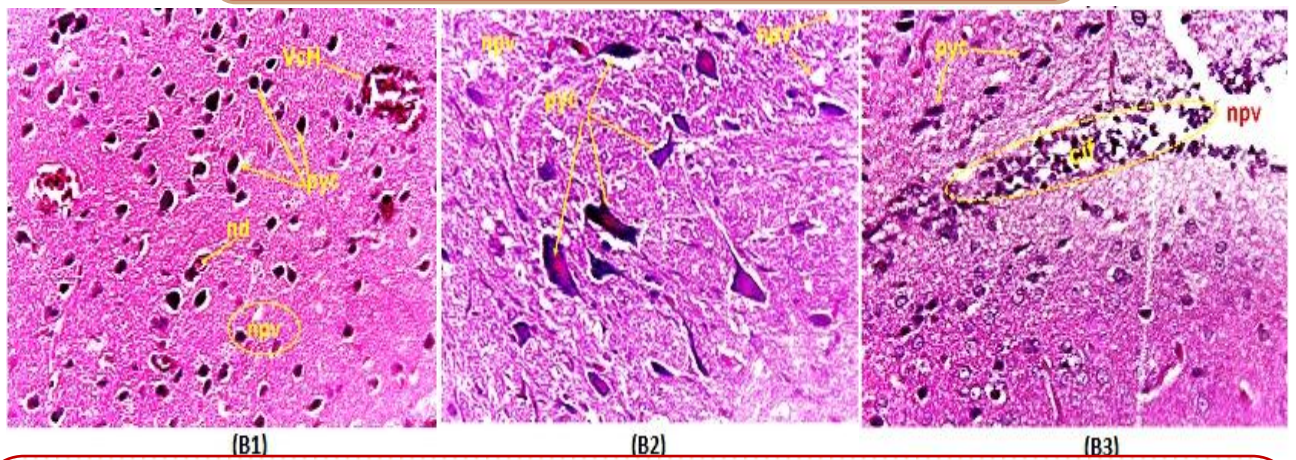
Les valeurs sont moyennes \pm SD, (n = 6), *: groupe CP vs groupe témoin; (** $p < 0,01$). ¥: groupe CP vs groupe CP + Vit. E; (¥¥ $p < 0,01$); †: groupe CP vs groupe CP + BECM (†† $p < 0,01$); £: groupe CP + Vit. E vs groupe CP + BECM (££ $p < 0,01$). Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est calculé comme suit: $100 \times (\text{valeurs de CP}) - \text{valeurs d'échantillons} / (\text{valeurs de CP}) - \text{valeurs de contrôle}$.

5. L'examen histopathologique

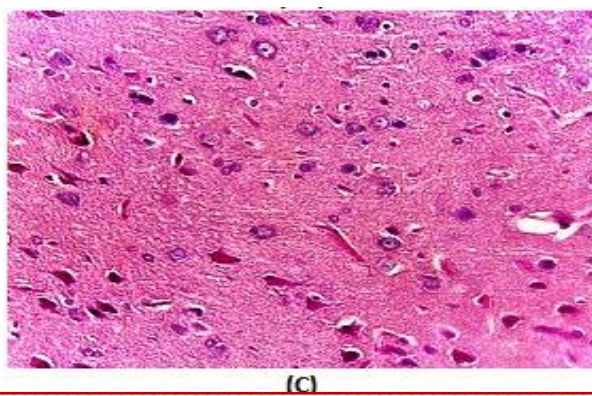
L'exposition des souris au CP a provoqué des lésions cérébrales importantes et a provoqué des altérations histopathologiques pouvant entraîner des lésions cérébrales, comme en témoigne la désorganisation des neurones en taille et en forme, la vacuolisation des neuropiles, l'infiltration des cellules inflammatoires et la congestion vasculaire (figure 42; B1, B2, B3). Le prétraitement par le BECM a atténué et minimisé les altérations histomorphologiques induites par le cisplatine et a empêché ces changements prouvés par une légère dégénérescence du tissu cérébral avec une altération histopathologique modérée (figure 42; C) par rapport à la Vit. E (figure 42; D et figure 43).



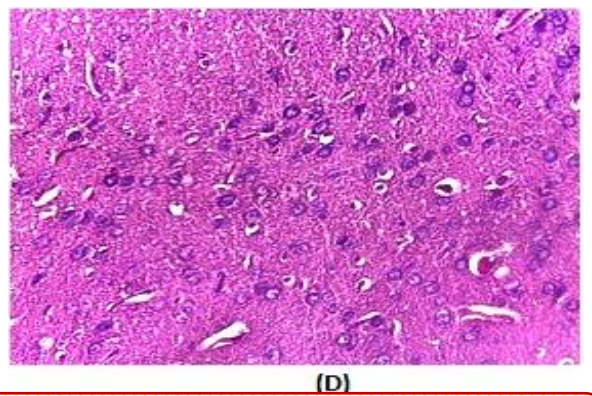
A : Groupe témoin : coupes histologiques du cortex cérébelleux montrant une histo-architecture normale: couche moléculaire (ML; population de neurones), cellule pyramidale (pyr; flèche), cellule de neuroglie (ng), capillaire (cp) .neuropil (np) (H&E. 400 x).



B: B1, B2, B3: Groupe CP:
 Modifications histologiques multifocales de la ML du cortex cérébral. La structure du cortex était désorganisée (B1, B2, B3).
 Vacuolisation neuropile (npv), dégénérescence neuronale (nd; B1, B2); flèche), cellules pyramidales endommagées irrégulières et rétrécissement cytoplasmique, noyaux pycnotiques colorés foncés (pyc; flèche;B3),cellules pyramidales vacuolées et hétérochromatiques (pyv; B3), infiltration cellulaire (Cif; B3), la congestion vasculaire et l'hémorragie (CV H; pointes de flèches; B2), (H & E.100 x).



C: (Groupe CP+BECM):diminution de l'incidence des lésions neuropathologiques: moins de vacuolations, moins des neurones endommagés, des cellules pyramidales presque normales, (H&E. 100 x).



D: (Groupe CP+ Vit. E) : aspect histologique presque normal, architecture cérébrale préservée et cellules pyramidales régulières (H & E.400 x).

Figure 42: Photomicrographie de l'analyse histopathologique des tissus cérébraux des souris.

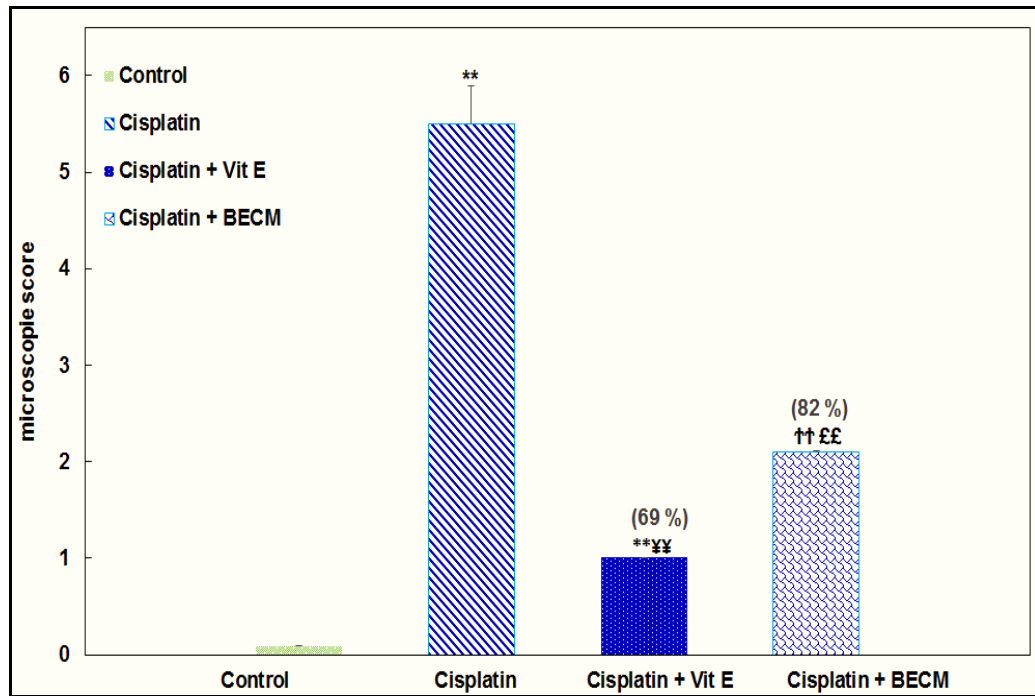


Figure 43 : Score du dommage histologique.

Les groupes : CP + BECM et CP + Vit.E avaient des scores des dommages histologiques inférieurs à ceux des souris traitées par le CP.

Les valeurs sont la moyenne \pm SD, * groupe CP vs groupe témoin; (** $p < 0,01$). ¥: groupe CP vs groupe CP + Vit.E; (¥¥ $p < 0,01$); †: groupe CP vs groupe CP + BECM († † $p < 0,01$).

III. Discussion

III.1. Discussion de l'étude expérimentale *in vitro*

Les antioxydants sont censés jouer un rôle très important dans le système de défense contre les ROS ou les radicaux libres dans l'organisme vivant (Ncir *et al.*, 2017). De ce fait la prévention contre les effets secondaires causés par les radicaux libres permet la préservation des constituants cellulaires et leur bon fonctionnement, est le rôle le vital des antioxydants (Aktumsek *et al.*, 2013).

De ce fait, des études expérimentales se sont penchées sur des produits naturels inoffensifs en l'occurrence les polyphénols. Ces derniers sont des métabolites secondaires importants présents dans les plantes (Noreen *et al.*, 2017), ces composés phénoliques sont doués d'une activité antioxydante importante, ce qui leur permet de réduire ou même d'éliminer le stress oxydatif (Das *et al.*, 2014).

Dans certains pays, diverses espèces de la plante *Centaurea* ont été exploitées en médecine alternative pour lutter contre plusieurs maladies (Aktumsek *et al.*, 2011), en raison de leurs importantes activités biologiques qui caractérisent les différentes espèces appartenant à cette plante (Khammar et Djeddi, 2012).

C'est pourquoi cette présente étude se veut d'étudier les effets neuroprotecteurs de l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea maroccana* contre la neurotoxicité induite par le cisplatine chez les souris *Albino wistar* comme modèle biologique.

Dans la présente étude, un dosage des flavonoïdes et des polyphénols totaux s'est imposé afin de caractériser l'extrait utilisé à partir de la partie aérienne de la plante *C. maroccana*. La raison principale du choix de quantifier les polyphénols parmi les différentes substances phytochimiques, réside en le fait que ces composés ont la capacité de démontrer de nombreuses activités biologiques à savoir, l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne et le pouvoir anticancéreux. De même pour les flavonoïdes qui sont considérés comme la classe la plus importante des polyphénols (Fadili *et al.*, 2017; Tel-Çayan *et al.*, 2018).

Les résultats de l'analyse quantitative révèlent la richesse de l'extrait butanolique de *C. maroccana* en termes des polyphénols (242, 30 µg GAE/mg d'extrait) renfermant (23, 34 µg QE/mg d'extrait) sous forme de flavonoïdes cela suggère que les polyphénols présents ne sont pas tous des flavonoïdes, ce qui explique la présence d'autres composés phénoliques.

✓ L'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'activité antioxydante, Six tests *in vitro* ont été réalisés dans cette étude pour déterminer l'activité antioxydante de l'extrait *n-BuOH* de la plante *C. maroccana*.

Le test à la β -carotène-acide linoléique a été utilisé pour estimer le taux d'inhibition de la peroxydation lipidique (Öztürk *et al.*, 2011). L'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux libres sont des dérivés hydro peroxydes en raison de l'élimination d'un atome d'hydrogène des groupes méthylène de l'acide linoléique (Laggoune *et al.*, 2016), tandis que ces radicaux libres peroxydés créés dans une émulsion, attaquent le chromophore β -carotène dont le résultat est le blanchiment de ce dernier, en perdant sa couleur jaune. L'existence d'un antioxydant dans ce mélange réactionnel piège les radicaux et inhibe l'oxydation (Tel-Çayan *et al.*, 2018).

L'extrait de *C. maroccana* a manifesté une activité antioxydante intéressante de blanchissement du β -carotène avec $IC_{50} = 11,08 \pm 0,30 \mu\text{g/ml}$. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Chaouche *et al.*, 2014) qui ont montré que l'extrait de la plante *Haloxylon articulatum* a manifesté une activité antioxydante d' $IC_{50} = 14,66 \pm 1,55 \mu\text{g/ml}$ au cours d'une étude réalisée pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de certaines espèces médicinales du sud Algérien. Cet effet est dû soit à l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique ou au piégeage des radicaux hydroperoxydes issus de la peroxydation de l'acide linoléique (effet scavenger) (Tepe *et al.*, 2005).

Le test à la DPPH a été fréquemment utilisé pour évaluer le potentiel antioxydant de plusieurs produits naturels où il est considéré comme une méthode rapide et peu coûteuse (Krishnamoorthy *et al.*, 2011). A température ambiante, le radical DPPH° présente une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance capable de saturer sa couche électronique. Cette réduction de la couleur rend compte du pouvoir piègeur des molécules testées. Ainsi, toute substance capable d'induire un changement de couleur du DPPH° du violet au jaune est considérée comme un piègeur du radical DPPH° et par conséquent comme un antioxydant (Nabavi *et al.*, 2012).

Les résultats obtenus dans notre étude par le test DPPH°, montrent que l'extrait butanolique de la plante *C. maroccana* a manifesté à son tour une activité antiradicalaire élevée à l'égard de ce radical d' $IC_{50} = 12,09 \pm 0,54 \mu\text{g/ml}$. Nos résultats sont en accord avec ceux de (Khalfallah *et al.*, 2017) qui ont démontré que l'extrait butanolique de *Evax pygmaea* possède une meilleure activité de piéger le radical DPPH° ($IC_{50} = 10,47 \pm 0,18 \mu\text{g/ml}$).

La méthode de piégeage des radicaux ABTS est la méthode la plus fiable qui inclut la détermination de la disparition des radicaux libres (Chandrashekhar *et al.*, 2009). Cette méthode est basée sur la capacité d'une molécule à piéger le radical ABTS^{•+} de couleur bleue pour le convertir à sa forme non radicalaire sans couleur (Besbes Hlila *et al.*, 2017).

L'évaluation du potentiel antioxydant en fonction du cation ABTS^{•+} montre que l'extrait butanolique dispose d'un bon pouvoir antioxydant ($IC_{50} = 15,13 \pm 0,87 \mu\text{g/ml}$). Comparativement à (Berhail Boudouda *et al.*, 2015), le résultat du test ABTS dans notre étude se rapproche d'une manière significative $IC_{50}=10.10\pm 0.2\mu\text{g/ml}$, alors que l'activité antiradicalaire de notre extrait est inférieure à celle obtenue par (Ferhat *et al.*, 2017) $IC_{50} = 29.08 \pm 1.29 \mu\text{g/ml}$.

Le radical superoxyde est le précurseur des espèces les plus réactives, reconnu comme l'une des espèces les plus nuisibles pour les inclusions cellulaires (Kumar *et al.*, 2012). La capacité de piéger les superoxydes par les antioxydants présents dans l'extrait est déterminée par la diminution de l'absorbance où il s'est avéré que l'extrait *n*-butanolique de *C. maroccana* a une excellente activité inhibitrice des anions superoxydes générés *in vitro* par le système DMSO alcalin avec $IC_{50}=4,50\pm 0,33 \mu\text{g/ml}$. Les résultats de cet étude sont en accord avec ceux de (Trifa *et al.*, 2020) $IC_{50} = 3,04\pm 0,16 \mu\text{g/ml}$, qui ont indiqués que l'extrait butanolique des feuilles de *Nicotiana glauca* récoltées en Algérie, avait une efficacité élevée pour piéger le radical superoxyde.

Afin de relier le potentiel antioxydant de cet extrait à la présence des composés bioactifs qui servent à donner des électrons induisant la réduction des métaux de transition, l'activité antioxydante a été évaluée par le test CUPRAC et le pouvoir réducteur.

Le test CUPRAC nécessite un équipement relativement standard, où il est largement utilisé pour déterminer les capacités antioxydantes des extraits des plantes, il a également fourni des résultats rapides et reproductibles (Tusevski *et al.*, 2014). La méthode CUPRAC est basée sur la réduction du Cu^{+2} en Cu^{+1} par des réducteurs (antioxydants) présents dans l'extrait (Nemati *et al.*, 2017). Une forte capacité antioxydante réductrice du CUPRAC a été observée à travers l'extrait *n*-BuOH de la plante *C. maroccana* suivi d'une valeur $A_{0,50} = 9,80 \pm 0,43\mu\text{g} /\text{ml}$ qui est comparée avec celle de (Bensouici, *et al.*, 2016) concernant l'extrait butanolique de la plante *Sedum caeruleum*. Ils ont observé une activité inhibitrice avec $A_{0,50} = 23.52\pm 0.44 \mu\text{g/ml}$ qui est supérieure à la nôtre.

Habituellement, le pouvoir réducteur est utilisé pour évaluer le potentiel et la capacité d'un antioxydant naturel à donner des électrons (Jamuna *et al.*, 2012), où il existe une corrélation entre les propriétés réductrices et l'existence des électrons réducteurs (Saha *et al.*,

2008). Alors que ces derniers jouent un rôle essentiel dans la conversion du (Fe^{3+}) de couleur jaune en (Fe^{2+}) de couleur bleu-vert. Dans cette étude, l'extrait de la plante *C. maroccana* a montré un fort pouvoir réducteur à $A_{0,50} = 14,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$, cela a été démontré par sa capacité de réduire le ferricyanure ferrique en augmentant l'absorbance avec la concentration. Nos résultats sont en accord avec celles rapportés par (Mouffouk *et al.*, 2019) dont $A_{0,50} = 12.13 \pm 0.52 \mu\text{g/ml}$, qui ont trouvés que l'extrait butanolique de l'espèce algérienne *Scabiosa stellata* L. présente une activité réductrice intéressante.

A travers ces résultats, nous pouvons déduire que les niveaux élevés de l'activité antioxydante *in vitro* via l'extrait butanolique étaient dus à leur richesse en composés phénoliques et aux flavonoïdes qui ont une puissante activité antioxydante. Il est indiqué que les composés phénoliques avaient une bonne corrélation avec l'activité antioxydante (Tel-Çayan *et al.*, 2011), qui est essentiellement due à leurs propriétés redox qui permettent de piéger les radicaux et les formes réactives de l'oxygène, et de jouer le rôle des chélateurs métalliques, des donneurs d'hydrogène et des agents réducteurs (Phang *et al.*, 2013), et jouent également un rôle important dans la stabilisation de la peroxydation lipidique (Vindhya et Leelavathi, 2015).

✓ Évaluation de la propriété neuroprotectrice

De nombreux agents chimioprotecteurs tels que les polyphénols auraient un effet neuroprotecteur, en particulier la curcumine (Al Moundhri *et al.*, 2013), l'hespéridine (Kamisli *et al.*, 2015), la rutine et la quercétine (Azevedo *et al.*, 2013).

L'acétylcholinestérase (AChE) est une sérine hydrolase, son rôle principal est l'arrêt de la transmission du flux nerveux au niveau des synapses cholinergiques par l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine (Ranjan et Kumari, 2017).

(Giacobini, 2004) a rapporté plusieurs inhibiteurs d'activité d'AChE traitaient les troubles du motoneurone, tels que la tacrine, la galantamine, le donépézil et la rivastigmine. De plus, des inhibiteurs naturels d'activité d'AChE ont été également étudiés, comme les polyphénols (Khan *et al.*, 2009).

Les résultats obtenus dans la présente étude suggèrent que l'extrait *n*-BuOH de la plante *C. maroccana* peut posséder une bonne inhibition de l'activité AChE *in vitro* ($\text{IC}_{50} = 186,57 \pm 5,08 \mu\text{g/ml}$) comparativement à la référence donepezil ($\text{IC}_{50} = 31,10 \pm 1,31 \mu\text{g/ml}$). Nos résultats sont relativement similaires à ceux obtenus par l'extrait butanolique de *Azorella glabra* Wedd d' $\text{IC}_{50} = 113,08 \pm 5,18 \mu\text{g/ml}$, qui a une activité inhibitrice d'AChE observée dans le travail de (Faraone *et al.*, 2019).

(Bar-On *et al.*, 2002) ont rapporté que les inhibiteurs d'AChE, qui comprennent des terpènes, des flavonoïdes et d'autres composés, semblent agir comme des inhibiteurs non compétitifs en se liant aux sites anioniques périphériques (PAS) d'AChE. A l'intérieur du cycle aromatique (cycle B), qui contient des groupes OH peut établir des liaisons avec le site PAS pour l'inhibition d'AChE, le groupe OH du côté phényle (cycle B) montre une liaison hydrogène avec des résidus dans le sous-site PAS (Karmakar *et al.*, 2019).

Les résultats *in vitro* ont clairement démontré la capacité du BECM à agir éventuellement en neutralisant les radicaux des acides gras polyinsaturés résultant du traitement prooxydant au nitroprussiate de sodium des homogénats cérébraux des souris.

Des études ont montré que le nitroprussiate de sodium induit l'effet oxydant par la libération de cyanure et / ou d'oxyde nitrique (Bates *et al.*, 1991), ce qui pourrait conduire à la formation d'espèces oxygénées hautement réactives, telles que les radicaux hydroxyles suivant la réaction de Fenton (Graf *et al.*, 1984).

Cependant, un traitement *in vitro* par le BECM a pu inhiber la peroxydation lipidique (LPO) induite par le le nitroprussiate de sodium (SNP), interrompant éventuellement les réactions en chaîne, qui, à leur tour, pourraient mettre fin à la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique.

Cette capacité inhibitrice de la peroxydation lipidique par l'extrait *n-BuOH* de la plante est due à son pouvoir antioxydant et antiradicalaire.

✓ Évaluation de l'activité antiproliférative

La prolifération cellulaire est une étape obligatoire lors de tout remodelage ou régénération des tissus (Fajas-Coll *et al.*, 2014). Fait intéressant, ce processus est étroitement contrôlé dans les cellules normales, tandis que les cellules cancéreuses possèdent une prolifération cellulaire excessive en raison du maintien de la signalisation proliférative et échappent aux suppresseurs de croissance (Peng *et al.*, 2019).

Parmi les produits naturels, les composés d'origine végétale ont été une source importante des plusieurs agents antiprolifératives notamment anticancéreux cliniquement utiles (Tietbohl *et al.*, 2017).

Dans la présente étude, l'effet cytotoxique de l'extrait butanolique de *C. maroccana* a été réalisé sur la lignée cellulaire HT29 (adénocarcinome du colon humain) qui a été utilisée pour étudier différents aspects de la biologie des cancers humains (Martínez-Maqueda *et al.*, 2015) et C6 qui est la lignée cellulaire la plus couramment utilisée en neuro-oncologie pour étudier la croissance et l'invasion des gliomes de haut grade. (Giakoumettis *et al.*, 2018).

Nos résultats ont suggérer que le BECM possède une activité antiproliférative significative sur les deux lignés cellulaires, ce qui appui des résultats antérieurs qui ont trouvé que certaines espèces de *Centaurea* avaient présenté des effets cytotoxiques (anticancéreux) contre certaines lignées cellulaires cancéreuses (Alper et Güneş, 2019 ; Lahneche et al., 2019).

Dans notre étude, on peut avancer que la propriété antiproliférative positive de l'extrait *n-BuOH* de *C. maroccana* pourrait être attribuée à la présence des composés phénoliques.

La prévention contre le cancer est l'une des propriétés biologiques des polyphénols. Leurs effets sur les lignées cellulaires cancéreuses humaines afin de protéger et de limiter le nombre ou la croissance des tumeurs (Basli et al., 2017).

Ainsi, les polyphénols sont considérés comme des sources moléculaires potentielles pour le traitement de diverses tumeurs malignes (Ding et al., 2020).

L'effet cytoprotecteur (c'est-à-dire chimiopréventif) des polyphénols est principalement attribué à leur activité antioxydante. Cependant, l'efficacité anticancéreuse réelle des polyphénols est due à leurs mécanismes indépendants des antioxydants, y compris leur action pro-oxydante dans les cellules cancéreuses (Amawi et al., 2017).

III. 2. Discussion de l'étude expérimentale *in vivo*

Les neurones sont des cellules très sensibles et son susceptibles d'être fortement affectés par l'utilisation des médicaments antitumoraux pour le traitement de diverses tumeurs malignes (Yadav et al., 2009).

Différents mécanismes ont été proposés pour élucider l'effet neurotoxique du cisplatine (CP), parmi lesquels le stress oxydatif, le dysfonctionnement mitochondrial, le dysfonctionnement cholinergique, les dommages de l'ADN, l'activation des cytokines pro-inflammatoires et l'apoptose (Turan et al., 2014).

Le tissu du système nerveux est l'un des tissus les plus sensibles au stress oxydatif, en raison de l'abondance en acides gras polyinsaturés dans ses inclusions, de sa forte consommation d'oxygène et de la présence de certains métaux de transition redox actifs (Halliwell, 2006; Dietrich et al., 2015). A cet effet, Il apparaît que les métabolites réactifs de l'oxygène, notamment les O_2^- , H_2O_2 , OH° issus de l'utilisation du CP ont joué un rôle important dans l'induction de la peroxydation lipidique (Khan et al., 2012).

Le dysfonctionnement cholinergique est un signe principal de la neurotoxicité. Dans la présente étude, la toxicité cérébrale induite par le CP a été caractérisée par une augmentation significative de l'activité AChE, ce qui est en accord avec des études précédentes ([Chtourou et al., 2015](#); [Jangra et al., 2016](#)). Il a été rapporté que l'expression de l'AChE peut être liée à l'apoptose et au stress oxydatif ([Melo et al., 2003](#); [Pick et al., 2006](#)). L'augmentation de la production des ROS est peut être l'une des raisons de l'augmentation de l'activité AChE. On a constaté que les ROS avaient provoqué la peroxydation de la membrane plasmique qui affecte l'intégrité et la fonctionnalité du système cholinergique ([Abdel-Wahab et Moussa, 2019](#)).

En outre, le CP a augmenté de manière significative l'activité de LDH dans le cerveau. La LDH est une enzyme cytoplasmique présente dans le cerveau est libérée dans le sang lorsque le neurone est altéré, par conséquent son augmentation sérique, reflète le degré de lésions cérébrales ([El-gazar et al., 2015](#)).

D'autre part, les niveaux accrus de la LDH dans le cerveau peuvent refléter la nécrose cellulaire cérébrale diffuse. L'oxydation des AGPI les rend plus hydrophiles, ce qui modifie la structure de la membrane cytoplasmique, aboutissant à des modifications de la fluidité et de la perméabilité membranaire pouvant causer des fuites de la LDH ([Sharma et al., 2005](#)).

Le pré-traitement par le BECM (200 mg/kg) pendant 10 jours réduit les déficits cognitifs induits par le CP, le dysfonctionnement cholinergique par la régulation à la baisse de l'expression de l'AChE et en réduisant considérablement le niveau de la peroxydation lipidique induite chez les souris traitées qui peut prouver la restauration de l'activité normale de la LDH.

Le stress oxydatif, qui est l'un des résultats les plus importants de la neurotoxicité induite par le CP, a été clairement prouvé dans la présente étude avec des souris exposées à la CP (8 mg / kg), comme l'indique le degré élevé de la peroxydation lipidique et la diminution du statut antioxydant.

La production excessive de MDA a été associée à une déplétion marquée du GSH dans le compartiment mitochondrial et cytosolique du neurone. L'épuisement du GSH semble également être un facteur déterminant, permettant la production de la peroxydation lipidique dans le groupe traité par le CP ([Sims et al., 2004](#); [Kamisli et al., 2014](#)). Le GSH, est le principal antioxydant intracellulaire et un agent de conjugaison, s'est avéré épuisé et sa fonction altérée dans les lésions cérébrales induites par le CP ([Kaya et al., 2016](#) ; [Koza et Linseman 2019](#)).

L'accumulation du CP dans des différents compartiments du cerveau pourrait être due à sa pénétration, y compris dans le cortex cérébral, à travers une détérioration de la barrière

hémato-encéphalique médiée par les radicaux libres (Charest *et al.*, 2013). Ainsi, la déplétion en GSH intracellulaire peut être expliquée par la conjugaison du CP avec le GSH cérébral (Townsend *et al.*, 2003).

D'autre part, l'administration du CP a également montré une diminution marquée des activités des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx et GST), ce qui explique la défaillance du système de défense antioxydant du cerveau.

Une approche similaire; a été rapportée concernant la diminution significative des enzymes de défense antioxydants neuronales induites par le CP (Kamisli *et al.*, 2014; Kaya *et al.*, 2016). La SOD1 et la SOD2 constituent les premiers composants du système de défense contre les effets délétères des oxyradicaux dans les compartiments cellulaires où le H₂O₂ résultant, peut être détruit par le GPx ou CAT (Moneim, 2014). Le GSH, qui est doté d'un rôle multifactoriel dans le mécanisme de défense antioxydante, est un substrat nécessaire à l'activité du GPx et de la GST (Ribas *et al.*, 2014; Hanfer *et al.*, 2018). La GST joue un rôle primordial dans la catalyse de la conjugaison du GSH avec de nombreux électrophiles, métabolites physiologiques et xénobiotiques (Zeng *et al.*, 2008). De plus, le GPx joue un rôle important dans la réduction du GSH et par conséquent l'accumulation du H₂O₂ (Tabassum *et al.*, 2010).

Les mitochondries sont considérées comme des cibles des médicaments anticancéreux (Zsengellér *et al.*, 2012). Une association directe entre le dysfonctionnement mitochondrial et la toxicité des agents chimiothérapeutiques a été rapportée par (Szewczyk et Wojtczak, 2002). Le stress oxydatif et le dysfonctionnement mitochondrial sont fréquemment impliqués dans la neurotoxicité par le CP (Tacka *et al.*, 2004).

D'une autre part, les effets néfastes du CP sont étroitement associés aux dommages et au dysfonctionnement de l'ADN mitochondrial (Pascoe et Roberts, 1974). Il a été suggéré également que le CP peut s'accumuler dans les mitochondries et former des adduits avec l'ADN mitochondrial (ADN mt) et les protéines (Melli *et al.*, 2008), qui à leur tour peuvent induire la production des ROS, entraînant ainsi une altération de la synthèse des protéines dans la chaîne respiratoire (Yang *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2012). Alors que, une respiration mitochondriale altérée et l'inhibition du système OXPHOS (Kim *et al.*, 2008) peuvent être à l'origine d'un échec de production d'énergie (Turrens, 2003).

La présente étude, montre que le statut oxydatif mitochondrial soit l'une des réponses importantes des lésions cérébrales induites par le CP. Le stress oxydatif mitochondrial et la déplétion du GSHmt sont des phénomènes centraux des lésions cérébrales induites par le CP;

la diminution de l'activité du SODmt a été également accompagnée d'une diminution des activités à la fois du GPxmt et GSTmt.

Bien que la GPx1 soit la principale isoforme localisée dans le cytosol, il semble qu'une petite fraction puisse se présenter dans la matrice mitochondriale (Arai *et al.*, 1999). Le GSHmt est également le principal moyen de défense contre les dommages oxydatifs des membranes mitochondriales (Ribas *et al.*, 2014) en assurant la réduction des groupes hydroperoxydes sur les phospholipides et autres lipido-peroxydes par l'action des GST-S transférases mitochondriales (GSTmt) (Sims *et al.*, 2004). Il a été rapporté également que le système du cycle redox du glutathion existe à la fois dans les compartiments cytosolo-mitochondriaux de la cellule (Zhang *et al.*, 2007).

Cependant, la présence de l'enzyme catalase dans les mitochondries cérébrales est controversée. Quelques études ont rapporté une diminution de l'activité de la catalase dans la fraction cérébrale et ont suggéré une absence de cette activité dans les mitochondries des cellules des mammifères, à l'exception des mitochondries du cœur des rats (Radi *et al.*, 1991). D'autre part, plusieurs études contredisent cette hypothèse et révèlent la présence d'une activité catalase dans les mitochondries des cellules de mammifères (Ahmed *et al.*, 2014).

Nos résultats sont en partie en accord avec de nombreux travaux qui ont indiqué la présence de la catalase dans la fraction mitochondriale de différentes parties du cerveau. (Yadav *et al.*, 2009; Munro *et al.*, 2016) ont mentionné que les mitochondries cérébrales sont susceptibles de réguler le H₂O₂ de la même manière que les mitochondries musculaires, car elles dépendent également des voies dépendantes de la respiration pour la consommation d' H₂O₂, avec une implication minimale de la catalase mitochondriale.

De même, notre étude a également montré que les résultats biochimiques et histopathologiques ont été conformes, ce qui a été montré dans la neurodégénérescence du tissu marqué dans le groupe CP.

Le prétraitement avec le BECM pendant une période de 10 jours a considérablement atténué les dommages oxydatifs dans le cerveau, ce qui a permis de restaurer les antioxydants dans les fractions mitochondriale et cytosolique, de la même manière que l'effet de la vitamine E qui a été rapporté comme un bon agent neuroprotecteur (Urso *et Clarkson*, 2003).

L'effet neuroprotecteur du BECM via la normalisation des différents paramètres pris en compte pourrait être dû à sa richesse en polyphénols. Ceci a été confirmé par l'analyse LC/MS, permettant l'identification de plusieurs composés dans le BECM, qui sont des types phénoliques et flavoniques, parmi lesquels les antioxydants les plus abondants et les plus

puissants, l'acide férulique ([Zduńska et al., 2018](#)) et l'acide rosmarinique ([Adomako -Bonsu, et al., 2017](#)).

En outre, les interactions synergiques avec d'autres contenus antioxydants identifiés tels que l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide gentisique, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique, l'acide gallique, l'acide chlorogénique et les flavonoïdes ; le kaempférol, la naringénine et la quercétine, pourraient être les principaux contributeurs aux capacités antioxydantes du BECM ([Joshi et al., 2012](#); [Kurek-Górecka et al., 2013](#); [Rashmi et al., 2018](#); [Tresserra-Rimbau et al., 2018](#)).

Nos précédentes études phytochimiques menées sur *Centaurea maroccana* ([Bentamene et al., 2007](#); [Bicha et al., 2011](#)) ont montré la présence des nombreux composés bioactifs parmi eux, les sesquiterpènes, lactones et flavonoïdes qui sont les principaux constituants du genre *Centaurea*, qui sont doués de propriétés antioxydantes du BECM. L'effet antioxydant de *Centaurea maroccana* a été soutenu par ([Baali et al., 2020](#)).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans la présente étude l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea maroccana* possède une forte activité antioxydante en piégeant plusieurs radicaux libres, cela est dû au contenu élevé en polyphénols et flavonoïdes présents dans la plante, cela indique la bonne corrélation entre ses propriétés et les teneurs phénoliques. Ces composées sont doués d'une activité antiproliférative importante.

D'autre part, la neurotoxicité sous l'effet d'une dose de (8mg/kg ; pc) de cisplatine chez les souris a été évidente. Cet agent chimiothérapeutique est susceptible de provoquer :

- ❖ Un déficit cognitif et un dysfonctionnement cholinergique par une élévation du taux d'AChE, aussi bien qu'une réduction du taux du LDH dans le tissu cérébral.
- ❖ Une diminution significative du système de défense antioxydant (CAT, SOD, GST, GP_x) et du taux du GSH a été enregistrée dans les deux fractions cérébrales cytosolique et mitochondriale ainsi qu'une diminution de la capacité antioxydante totale (TAC), et une augmentation significative de la peroxydation lipidique signalée suite à une estimation du taux du MDA.
- ❖ Des modifications neurodégénératives remarquables au niveau des tissus cérébraux.

Le prétraitement des souris par le *n-BuOH* de *Centaurea maroccana* (BECM) a permis de :

- ❖ Atténuer les marqueurs de dysfonctionnement cérébral (activités AChE et LDH).
- ❖ Empêché les dommages cérébraux induits par le CP en rétablissant les défenses antioxydantes des (SOD, CAT et glutathion métabolisant les niveaux d'enzymes) et en réduisant le taux du MDA.
- ❖ Réduction du pourcentage des changements histomorphologiques provoqués par le cisplatine.

Nous concluons que l'effet neuroprotecteur du BECM pourrait être dû à sa diversité phytochimique et semble être lié à la richesse en polyphénols confirmée par l'analyse LC/MS.

De ce fait, nous espérons que nos résultats ouvriront l'horizon pour d'autres études approfondis notamment au niveau moléculaire, pour pouvoir élucider et démontrer si les produits naturels de la plante étudiée peuvent interférer avec certaines voies moléculaires afin d'assurer une meilleure neuroprotection.

Références bibliographiques

A

- **Abdal Dayem A., Hossain M., Lee S., Kim K., Saha S., Yang GM., Choi HY., Cho SG. (2017).** The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1): 120.
- **Abdel-Wahab WM., Moussa FI. (2019).** Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. *Drug Des Devel Ther*, 13:1155-1162.
- **Abid M., Yaich H., Cheikhrouhou S., Khemakhem I., Bouaziz M., Attia H., Ayadi MA. (2017).** Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC-MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. *J Food Sci Technol*, 54(9): 2890-2901.
- **Adomako-Bonsu AG., Chan S., Pratten M., Fry JR. (2017).** Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicol in Vitro*, 40: 248-255.
- **Aebi H. (1984).** Catalase in vitro. *Methods Enzym*, 1105:121-26.
- **Ahmed LA., Shehata NI., Abdelkader NF., Khattab MM. (2014).** Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through alleviation of mitochondrial dysfunction in mice. *PLoS ONE*, 9(10): e108889.
- **Ajith TA., Abhishek G., Roshny D., Sudheesh NP. (2009).** Co-supplementation of single and multi doses of vitamins C and E ameliorate cisplatin-induced acute renal failure in mice. *Exp Toxicol Pathol*, 61: 565-571.
- **Akkol EK., Arif R., Ergun F., Yesilada E. (2009).** Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2):210-215.
- **Akman T., Akman L., Erbas O., Terek Mc., Taskiran D., Ozsaran A. (2015).** The preventive effect of oxytocin to cisplatin-induced neurotoxicity: an experimental rat model. *Bio Med Research International*, 1-5.
- **Aktumsek A., Zengin G., Guler GO., Cakmak YS., Duran A. (2011).** Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea L.* species from Turkey flora. *Food Chem Toxicol*, 49(11): 2914-2920.

- **Aktumsek A., Zengin G., Guler GO., Cakmak YS., Duran A. (2013).** Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea L.* species. *Food Chem Toxicol*, 55:290-296.
- **Al Moundhri MS., Al-Salam S., Al Mahrouqee A., Beegam S., Ali BH. (2013).** The effect of curcumin on oxaliplatin and cisplatin neurotoxicity in rats: some behavioral, biochemical, and histopathological studies. *J Med Toxicol*, 9: 25-33.
- **Aldossary SA. (2019).** Review on pharmacology of cisplatin: clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 12(1):7-15.
- **Aliouche L., Mosset Pl., León F., Brouard I., Benayache S., Sarri D., Benayache F. (2019).** Characterization of chemical compounds and antioxidant activity of *Centaurea solstitialis* ssp. *Schouwii* (DC.) Q. Et S.(Asteraceae). *Curr Bioact Compd*, 15(0): 1-9.
- **Almutairi MM., Alanazi WA., Alshammari MA., Alotaibi MR., Alhoshani AR., Al-Rejaie SS., Hafez MM., Al-Shabanah OA. (2017).** Neuro-protective effect of rutin against Cisplatin-induced neurotoxic rat model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17: 472-481.
- **Alper M., Güneş H. (2019).** The anticancer and anti-inflammatory effects of *Centaurea solstitialis* extract on human cancer cell lines. *Turk J Pharm Sci*, 16(3):273-281.
- **Amawi H., Ashby C., Samuel T., Peraman R., Tiwari A. (2017).** Polyphenolic nutrients in cancer chemoprevention and metastasis: role of the epithelial-to-mesenchymal (EMT) pathway. *Nutrients*, 9(8): 911.
- **Amiel-Tison C., Gosselin Julie. (2010).** Système nerveux central: anatomie, physiologie. *Pathologie neurologique périnatale et ses conséquences*, P: 5-13.
- **Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir SE. (2004).** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem*, 52: 7970-7981.
- **Arai M., Imai H., Koumura T., Yoshida M., Emoto K., Umeda M., Chiba N., Nakagawa Y. (1999).** Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *J Biol Chem*, 274(8): 4924-4933.

- **Aydin D., Peker EG., Karakurt MD., Gurel A., Ayyildiz M., Cevher ŞC., Agar E., Dane S. (2016).** Effects of Ginkgo biloba extract on brain oxidative condition after cisplatin exposure. *Clin Invest Med*, 39 (6):100-105.
- **Azevedo MI., Pereira AF., Nogueira RB., Rolim FE., Brito GAC., Wong TDV., Lima-Júnior RCP., Ribeiro RA., Vale ML. (2013).** The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Molecular Pain*, 9(53): 1-14.

B

- **Baali N., Baali S., Bentamen A., Benayache S., Benayache F., Ameddah S. (2020).** Ameliorative effect of *Centaurea maroccana* and *Centaurea acaulis* against nephrotoxicity induced by carbon tetrachloride. *Curr Bioact Compd*, 16(2): 174-18.
- **Barabas K., Milner R., Lurie D., Adin C. (2008).** Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol*, 6(1):1-18.
- **Bar-On P., Millard CB., Harel M., Dvir H., Enz A., Sussman JL., Silma I. (2002).** Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry*, 41(11): 3555-3564.
- **Basli A., Belkacem N., Amrani I. (2017).** Health benefits of phenolic compounds against cancers. *Phenolic compounds - biological activity*. P : 194-210.
- **Bates JN., Baker MT., Guerra RJr., Harrison DG. (1991).** Nitricoxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem Pharmacol*, 42:157-165.
- **Beaudeau JL., Peynet J., Bonnefont-Rousselot D., Therond P., Delattre J., Legrand A. (2006).** Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6): 373-381.
- **Beijers AJM, Jongen JLM., Vreugdenhil G. (2012).** Chemotherapy-induced neurotoxicity: the value of neuroprotective strategies. *Neth J Med*, 70(1):18-25.
- **Belbache H., Mechehoud Y., Chalchat JC., Figueredo G., Chalard P., Benayache S., Benayache F. (2017).** Essential oil composition of *Centaurea sempervirens* L. (Asteraceae). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(1):79-82.
- **Belviranli M., Okudan N. (2015).** Well-Known Antioxidants and Newcomers in Sport Nutrition: Coenzyme Q10, Quercetin, Resveratrol, Pterostilbene, Pycnogenol

- and Astaxanthin. In: Lamprecht M, editor. *Antioxidants in Sport Nutrition*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Chapter 5.
- **Bensakhria A. (2018)**. Le Stress Oxydatif. In book: *Toxicologie Générale*. P: 70-86.
 - **Bensouici C., Kabouche A., Karioti A., Öztürk A., Duru ME., Bilia AR., Kabouche Z. (2016)**. Compounds from *Sedum caeruleum* with antioxidant, anticholinesterase, and antibacterial activities. *Pharmaceutical Biology*, 54(1):174-179.
 - **Bentamene A. (2004)**. Extraction, séparation et détermination des structures des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Centaurea* : *C. maroccana* et *C. acaulis*. Thèse de doctorat université Mentouri Constantine.
 - **Bentamene A., Benayache S., Creche J., Bermejo J., Benayache F. (2007)**. Sesquiterpene lactones and phenolic compounds from *Centaurea maroccana*. *Chem Nat Compd*, 43(6): 749-750.
 - **Berhail Boudouda H., Zeghib A., Karioti A., Bilia AR., Öztürk M., Aouni M., Kabouche A., Kabouche Z. (2015)**. Antibacterial, antioxidant, anti-cholinesterase potential and flavonol glycosides of *Biscutella raphanifolia* (Brassicaceae). *Pak J Pharm Sci*, 28(1):153-158.
 - **Berta T., Qadri Y., Tan PH., Ji RR. (2017)**. Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(7): 695-703.
 - **Besbes Hlila M., Ben Saad A., Ben Jannet H., Aouni M., Mastouri M., Selmi B. (2017)**. Etude chimique et biologique des extraits de la plante *Halocnemeum strobilaceum* (pall) bieb. *Journal of Bioresources Valorization (JBV)*, 2(1): 42-48.
 - **Bican O., Minagar A., Pruitt AA. (2013)**. The spinal cord: a review of functional neuroanatomy. *Neurol Clin*, 31(1):1-18.
 - **Bicha S., Bentamene A., Benaissa O., Benayache S., Garcia P., Leon F., Brouard I., Bermejo J., Benayache F. (2011)**. Flavonoid aglycones from *Centaurea maroccana*. *Chem Nat Compd*, 47 (1): 105-106.
 - **Birben E., Sahiner UM., Sackese C, Erzurum S., Kalayci O. (2012)**. Oxidative stress et antioxidant defense. *WAO Journal*, 5(1): 9-19.
 - **Blois MS. (1958)**. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200.
 - **Böhm V. (2018)**. Vitamin E. *Antioxidants*, 7(3):44.

- **Boros B., Jakabová S., Dörnyei A., Horváth G., Pluhár Z., Kilár F., Felinger A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. *J Chromatogr A*, 1217(51):7972-80.
- **Bouratoua A., Khalfallah A., Bensouici C., Kabouche Z., AlabdulMagid A., Harakat D., Voutquenne-Nazabadioko L., Kabouche A. (2017).** Chemical composition and antioxidant activity of aerial parts of *Ferula longipes* Coss. ex Bonnier and Maury. *Nat Prod Res*, 32(16):1873-1880.
- **Bülent Köse Y., İşcan G., Demirci B., Başer KHC., Çelik S. (2007).** Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis*. *Fitoterapia*, 78(3): 253-254.
- **Burton G.J., Jauniaux E. (2011).** Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3): 287-299.

C

- **Carter WG., Tarhoni M., Rathbone AJ., Ray DE. (2007).** Differential protein adduction by seven organophosphorus pesticides in both brain and thymus. *Hum Exp Toxicol*, 26:347-353.
- **Chandrashekar HR., Venkatesh P., Arumugam M., Vijayan P. (2009).** Estimation of total phenols with special emphasis to antioxidant potentials of few *Hypericum* species. *Pharmacologyonline*, 1: 680-687.
- **Chaouche TM., Haddouchi F., Ksouri R., Atik-Bekkara F. (2014).** Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMA*, 77(6):302-307.
- **Charest G., Sanche L., Fortin D., Mathieu D., Paquette B. (2013).** Optimization of the route of platinum drugs administration to optimize the concomitant treatment with radiotherapy for glioblastoma implanted in the Fischer rat brain. *J Neurooncol*, 115(3): 365-373.
- **Cho TA. (2015).** Spinal Cord Functional Anatomy. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, 21:13-35.
- **Choi YM., Kim HK., Shim W., Anwar MA., Kwon JW., Kwon HK., Kim HJ., Jeong H., Kim HM., Hwang D., Kim HM., Sangdun C, Choi S. (2015).** Mechanism of cisplatin-induced cytotoxicity is correlated to impaired metabolism due to mitochondrial ROS generation. *PLoS ONE*, 10(8):e0135083.

- **Choudhary RK., Swarnkar PL. (2011).** Antioxidant activity of phenolic and flavonoid compounds in some medicinal plants of India. *Natural Product Research*, 25(11) :1101-1109.
- **Choy KW., Murugan D., Leong XF., Abas R., Alias A., Mustafa MR. (2019).** Flavonoids as natural anti-inflammatory agents targeting nuclear factor-kappa b (Nfkb) signaling in cardiovascular diseases: a mini review. *Frontiers in Pharmacology*, 10: 1295.
- **Chtourou Y., Aouey B., Kebieche M., Fetou H. (2015).** Protective role of naringin against cisplatin induced oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in rat striatum via suppressing ROS-mediated NF- κ B and P53 signaling pathways. *Chemico-Biological Interactions*, 239: 76-86.
- **Chtourou Y., Gargouri B., Kebieche M., Fetoui H. (2015).** Naringin abrogates cisplatin-induced cognitive deficits and cholinergic dysfunction through the down-regulation of AChE expression and iNos signaling pathways in hippocampus of aged rats. *J Mol Neurosci*, 56(2):349-362.
- **Crossman AR., Neavy D. (2004).** Neuroanatomie. Paris: Elsevier Masson. 174 P.
- **Cutrim CS., Cortez MAS. (2018).** A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3):564-578.

D

- **Daglia M. (2012).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2):174-181.
- **Dai Q., Geng H., Yu Q., Hao J., Cui J. (2019).** Polyphenol-based particles for theranostics. *Theranostics*, 9(11) : 3170-3190.
- **Das N., Islam ME., Jahan N., Islam MS., Khan A., Islam MR., Parvin M S. (2014).** Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. *BMC Complement Altern Med*, 14(45).
- **Dasari S., Tchounwou BP. (2014).** Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740:364-378.
- **Deavall DG., Martin EA., Horner JM., Roberts R. (2012).** Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of toxicology*, 2012:645460.

- **Di Meo S., Reed TT., Venditti P., Victor VM. (2016).** Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016:1245049.
- **Dietrich J., Prust M., Kaiser J. (2015).** Chemotherapy, cognitive impairment and hippocampal toxicity. *Neuroscience*, 308: 224-232.
- **Ding S., Xu S., Fang J., Jiang H. (2020).** The protective effect of polyphenols for colorectal cancer. *Frontiers in Immunology*, 11: 1407.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4): 654-660.

E

- **El Khawand T., Courtois A., Valls J., Richard T., Krisa S. (2018).** A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews*, 17(5): 1007-1029.
- **El-gazar A., Sayed Mohamed Awad A., El-demerdash E. (2015).** Role of oxidative stress in traumatic brain injury. *Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(1): 41-52.
- **Ellman GL., Courtney KD., Andres VJr., Feather-stone RM. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7:88-95.
- **Engwa GA. (2018).** Free radicals and the role of plant phytochemicals as antioxidants against oxidative stress-related diseases. *Phytochemicals - Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention. BoD-Books on Demand*. P: 49-74.
- **Escher GB., Santos JS., Rosso ND., Marques MB., Azevedo L., Vieira do Carmo MA., Dagher H., Molognoni L., Do-Prado-Silva L., Sant'Ana AS., da Silva CM., Granato D. (2018).** Chemical study, antioxidant, antihypertensive, and cytotoxic/cytoprotective activities of *Centaurea cyanus* L. petals aqueous extract. *Food Chem Toxicol*, 118:439-453.

F

- **Fadili k., Zerkani H., Amalich S., Zair T. (2017).** Etude phytochimique et evaluation de l'activite antioxydante des feuilles et des fruits du *Capparis spinosa L.* *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 5(2):108-118.
- **Fajas-Coll L., Lagarrigue S., Hure S., Lopez-Mejía I., Denechaud PD. (2014).** Cell cycle and metabolic changes during tissue regeneration and remodeling. *Pathobiology of Human Disease*. P: 542-549.
- **Fanucchi MV. (2014).** Development of Antioxidant and Xenobiotic Metabolizing Enzyme Systems. In: *Harding R., Pinkerton KE. (Eds.), The Lung, second edition.* Academic Press, Boston. P: 223-231.
- **Faraone I., Rai DK., Russo D., Chiummiento L., Fernandez E., Choudhary A., Milella L. (2019).** Antioxidant, antidiabetic, and anticholinesterase activities and phytochemical profile of *Azorella glabra Wedd.* *Plants*, 8(8): 265.
- **Favier A. (2003).** Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. P: 108-115.
- **Favier A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6) :390-396.
- **Ferhat M., Erol E., Beladjila KA., Çetintaş Y., Duru ME., Öztürk M., Kabouche A., Kabouche Z. (2017).** Antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Stachys guyoniana* and *Mentha aquatica*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 324-329.
- **Figueira I., Menezes R., Macedo D., Costa I., Nunes dos Santos C. (2017).** Polyphenols beyond barriers: a glimpse into the brain. *Current Neuropharmacology*, 15: 562-594.
- **Fix J. (2012).** Board Review Series. *Neuroanatomy. Philadelphia*, 177 P.
- **Florea AM., Büsselberg D. (2011).** Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3(1): 1351-1371.
- **Forati E., Sabouni A., Ray S., Head B., Schoen C., Sievenpiper D. (2015).** Neurotransmitter specific, cellular-resolution functional brain mapping using receptor coated nanoparticles: assessment of the possibility. *PLoS ONE*, 10(12), e0145852.

G

- **Gardès-Albert M. (2006).** Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6):365-372.
- **Gasparrini M., Forbes-Hernandez TY., Giampieri F., Afrin S., Mezzetti B., Quiles JL., Bompadre S., Battino M. (2017).** Protective effect of strawberry extract against inflammatory stress induced in human dermal fibroblasts. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(1):164.
- **Giacobini E. (2004).** Cholinesterase inhibitors: New roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res*, 50(4):433-440.
- **Giakoumettis D., Kritis A., Foroglou N. (2018).** C6 cell line: the gold standard in glioma research. *Hippokratia*, 22(3):105-112.
- **Gómez-Ruiz S., Maksimović-Ivanić D., Mijatović S., Kaluđerović GN. (2012).** On the discovery, biological effects, and use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2012: 14028.
- **Graf E., Mahoney JR., Bryant RG., Eaton JW. (1984).** Iron-catalyzed Hydroxyl Radical Formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 259 (6): 3620-3624.
- **Grienke U., Brkanac SR., Vujci V., Urban E., Ivankovic S., Stojkovic R., Rollinger JM., Kralj J., Brozovic A., Stojkovic RM. (2018).** Biological Activity of flavonoids and rare sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea ragusina L.* *Front Pharmacol*, 9:1-15.
- **Grill MF., Maganti RK. (2011).** Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 72(3):381-393.
- **Gulec M., Oral E., Dursun OB., Yucel A., Hacimuftuoglu A., Akcay F., Suleyman H. (2013).** Mirtazapine protects against cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage in the rat brain. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 67: 50-58.

H

- **Habig WH., Pabst MJ., Jakoby WB. (1974).** Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249:7130-7139.
- **Haleng J., Pincemail J., Defraigne JO., Charlier C., Chapelle JP. (2007).** Le stress oxidant. *Rev Med Liege*, 62(10): 628.

- **Halliwell B. (2006).** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141(2): 312-322.
- **Halliwell B. (2006).** Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *J Neurochem*, 97(6):1634-1658.
- **Handa N., Bhardwaj R., Kaur HP., Kapoor D., Rattan A., Kapoor N. (2016).** Chapter 7: Selenium: An Antioxidative Protectant in Plants Under Stress. *In Plant Metal Interaction. Ahmad (Ed.)*. P: 179-207.
- **Hanfer M., Cheriet T., Menad A., Seghiri R., Benayache S., Benayache F., Ameddah S. (2018).** Modulation of liver glutathione-dependent enzymes and steatosis by *Linaria tingitana* in sodium valproate-treated rats. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 24(2):173-184.
- **Heidari-Soreshjani S., Asadi-Samani M., Yang Q., Saeedi-Boroujeni A. (2017).** Phytotherapy of nephrotoxicity-induced by cancer drugs: an updated review. *Journal of nephropathology*, 6(3): 254-263.
- **Hellwing FH. (2004).** Centaureinae (Asteraceae) in the Mediterranean history of ecogeographical radiation. *Plant Syst. Evol*, 246:137-162.
- **Hervé G. (2009).** Physiologie Humaine. *France. Pradel*. P: 418.
- **Hilpold A., Garcia-Jacas N., Vilatersana R., Susanna A. (2014).** Taxonomical and nomenclatural notes on *Centaurea*: A proposal of classification, a description of new sections and subsections, and a species list of the redefined section *Centaurea*. *Collectanea Botanica*, 33: 1-29.
- **Hinduja S., Kraus KS., Manohar S., Salvi RJ. (2015).** D-methionine protects against cisplatin-induced neurotoxicity in the hippocampus of the adult rat. *Neurotox Res*, 27(3): 199-204.
- **Hosseinimehr SJ. (2015).** The protective effects of trace elements against side effects induced by ionizing radiation. *Radiation Oncology Journal*, 33(2): 66.
- **Huyut Z., Beydemir Ş., Gülçin İ. (2017).** Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochemistry Research International*, 2017:7616791.

J

- **James SE., Burden H., Burgess R., Xie Y., Yang T., Massa SM., Longo FM., Lu Q. (2008).** Anti-cancer drug induced neurotoxicity and identification of Rho pathway signaling modulators as potential neuroprotectants. *NeuroToxicology*, 29(4):605-612.
- **Jamuna S., Paulsamy S., Karthika K. (2012).** Screening of *in vitro* antioxidant activity of methanolic leaf and root extracts of *Hypochoeris radicata* L. (Asteraceae). *J Appl Pharm Sci*, 2(7): 149-154.
- **Jangra A., Kwatra M., Singh T., Pant R., Kushwah P., Ahmed S., Dwivedi D., Saroha B., Lahkar M. (2016).** Edaravone alleviates cisplatin-induced neurobehavioral deficits via modulation of oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol*, 15(791):51-61.
- **Jessen KR. (2004).** Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(10): 1861-1867.
- **Johnson D., Lardy HA. (1967).** Isolation of liver or kidney mitochondria. In: *Methods in Enzymology*, Vol. X, Oxidation and Phosphorylation, Kaplan, NP, NP Colowick, RW Estabrook, ME Oullman, eds. *Academic, New York*, [10](#): 94-96.
- **Jomova K., Valko M. (2011).** Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283: 65-87.
- **Joshi R., Gangabhagirathi R., Venu S., Adhikari S., Mukherjee T. (2012).** Antioxidant activity and free radical scavenging reactions of gentisic acid: *in vitro* and pulse radiolysis studies. *Free Radic Res*, 46(1): 11-20.

K

- **Kabel AM. (2014).** Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition. *World Journal of Nutrition and Health*. 2(3): 35-38.
- **Kamisli S., Ciftci O., Cetin A., Kaya K., Kamisli O., Celik H. (2014).** Fish oil protects the peripheral and central nervous systems against cisplatin-induced neurotoxicity. *Nutr Neurosci*, 17(3): 116-126.
- **Kamisli S., Ciftci O., Kaya K., Cetin A., Kamisli O., Ozcan C. (2015).** Hesperidin protects brain and sciatic nerve tissues against cisplatin induced oxidative, histological and electromyographical side effects in rats. *Toxicol Ind Health*, 31(9):841-851.

- **Kang MA., So EY., Simons AL., Spitz DR., Ouchi T. (2012).** DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/ Rac1 pathway. *Cell Death Dis*, 3 (249): 1-8.
- **Karak P. (2019).** Biological activities of flavonoids: an overview. *Int J Pharm Sci & Res*, 10(4): 1567-1574.
- **Karavelioglu E., Boyaci MG., Simsek N., Sonmez MA., Koc R., Karademir M., Guven M., Eser O. (2015).** Selenium protects cerebral cells by cisplatin induced neurotoxicity. *Acta Cir Bras*, 30(6): 394-400.
- **Karmakar A., Ambure P., Mallick T., Das S., Roy K., Begum NA. (2019).** Exploration of synthetic antioxidant flavonoid analogs as acetylcholinesterase inhibitors: an approach towards finding their quantitative structure activity relationship. *Med Chem Res*, 28 (5): 723-741.
- **Kartalou M., Essigmann JM. (2001).** Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res*, 478(1-2):23-43.
- **Kaushal J., Mehandia S., Singh G., Raina A., Arya SK. (2018).** Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16:192-199.
- **Kaya K., Ciftci O., Cetin A., Tecelioğlu M., Başak N. (2016).** Beneficial effects of β -glucan against cisplatin side effects on the nervous system in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 31 (3): 198-205.
- **Khalfallah A., Berrehal D., Bensouici C., Kabouche A., Semra Z., Voutquenne-Nazabadioko L., Alabdul Magid A., Kabouche Z. (2017).** Flavonoids, cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Evax pygmaea*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 2292-2296.
- **Khammar A., Djeddi S. (2012).** Pharmacological and biological properties of some *Centaurea* species. *European Journal of Scientific Research*, 84: 398-416.
- **Khan MTH., Orhan I., Senol FS., Kartal M., Sener B., Dvorský M., Smejkal M., Slapetov T. (2009).** Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem Biol Interact*, 181: 383-389.
- **Khan R., Khan AQ., Qamar W., Lateef A., Tahir M., Rehman MU., Ali F., Sultana S. (2012).** Chrysin protects against cisplatin-induced colon toxicity via

- amelioration of oxidative stress and apoptosis: Probable role of p38MAPK and p53. *Toxicol Appl Pharmacol*, 258: 315-329.
- **Kim JS., Lee JH., Jeong WW., Choi DH., Cha HJ., Kim DH., Kwon JK., Park SE., Park JH., Cho HR., Lee SH., Park SK., Lee BJ., Min YJ., Park JW. (2008).** Reactive oxygen species-dependent EndoG release mediates cisplatin-induced caspase independent apoptosis in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer*, 122(3): 672-680.
 - **Koch W. (2019).** Dietary polyphenols-important non-nutrients in the prevention of chronic noncommunicable diseases. A systematic review. *Nutrients*, 11(5):1039.
 - **Kohen R., Nyska A. (2002).** Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6):620-650.
 - **Koracevic D., Koracevic G., Djordjevic V., Andrejevic S., Cosic V. (2001).** Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol*, 54:356-361.
 - **Kornberg A. (1955).** Lactate dehydrogenase of muscle. *Meth Enzymol*, 1:441-444.
 - **Koza L., Linseman DA. (2019).** Glutathione precursors shield the brain from trauma. *Neural Regen Res*, 14(10): 1701-1702.
 - **Krishnamoorthy M., Sasikumar J., Shamna R., Pandiarajan C., Sofia P., Nagarajan B. (2011).** Antioxidant activities of bark extract from mangroves, *Bruguiera cylindrica* (L.) Blume and *Ceriops decandra* Perr. *Indian J Pharmacol*, 43(5): 557.
 - **Kumar G., Baojun X. (2017).** A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. *Nutrients*, 9(5): 455.
 - **Kumar Keshari A., Kumar Verma A., Kumar T., Srivastava R. (2015).** Oxidative stress: a review. *The International Journal Of Science & Technology*, 3(7):155-162.
 - **Kumar RS., Rajkapoor B., Perumal P. (2012).** Antioxidant activities of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC using various in vitro assay models. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2(4):256-261.
 - **Kurek-Górecka A., Rzepecka-Stojko A., Górecki M., Stojko J., Sosada M., Świerczek-Zięba G. (2013).** Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, 19: 78-101.

- **Kurutas EB. (2016).** The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative. *Nutrition Journal*, 15(1):71.

L

- **La Pointe NE., Morfini G., Brady ST., Feinstein SC., Wilson L., Jordan MA. (2013).** Effects of eribulin, vincristine, paclitaxel and ixabepilone on fast axonal transport and kinesin-1 driven microtubule gliding, implications for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Neurotoxicology*, 37:231-9.
- **Laggoune S., Öztürk M., Erol E., Duru ME., Abaza I., Kabouche A., Kabouche Z. (2016).** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oil of *Mentha spicata* L. from Algeria. *J Mater Environ Sci*, 7: 4205-13.
- **Lahneche AM., Boucheham R., Ozen T., Altun M., Boubekri N., Demirtas I., Bicha S., Bentamene A., Benayache F., Benayache S., Zama D. (2019).** In vitro antioxidant, DNA-damaged protection and antiproliferative activities of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *Centaurea sphaerocephala*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(3): 1-11.
- **Li C., Miao X., Li F., Wang S., Liu Q., Wang Y., Sun J. (2017).** Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev*, 2017:9702820.
- **Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr Al., Randall RJ. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem*, 193:265-275.
- **Lu J., Holmgren A. (2014).** The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66:75-87.

M

- **Marco GJ. (1968).** A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 45: 594-598.
- **Marengo B., Nitti M., Furfaro AL., Colla R., Ciucis CD., Marinari UM., Pronzato MA., Traverso N., Domenicotti C. (2016).** Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: crucial players in cancer growth and therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016:6235641.

- **Marieb EN., Hoehn K. (2012).** Human Anatomy & Physiology. *Adapted from Human Anatomy & Physiology. 9^{ème} édition.* Boston Pearson. P1264.
- **Marklund S., Marklund G. (1974).** Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 47:469-474.
- **Martínez-Maqueda D., Miralles B., Recio I. (2015).** HT29 cell line. *The Impact of Food Bioactives on Health.* P: 113-124.
- **McCorry LK. (2007).** Physiology of the Autonomic Nervous System. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 71(4):78.
- **Medjroubi K., Benayache F., Bermejo J. (2005).** Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia*, 76: 744-746.
- **Mehmood Rao K., Parker J., Shakil A., Eyas Q., Mohammed Ahmed A, Zeeshan M., Ernest J. (2014).** Review of cisplatin and oxaliplatin in current immunogenic and monoclonal antibodies perspective. *World J Oncol*, 5(3):97-108.
- **Mehta SK., Gowder SJT. (2015).** Members of antioxidant machinery and their functions. In Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress. *In tech Open.*
- **Melli G., Taiana M., Camozzi F., Triolo D., Podini P., Quattrini A., Taroni F., Lauria G. (2008).** Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. *Exp Neurol*, 214: 276-284.
- **Melo JB., Agostinho P., Oliveira CR. (2003).** Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neurosci Res*, 45(1): 117-127.
- **Meyerholz KD., Beck PA. (2019).** Fundamental concepts for semiquantitative tissue scoring in translational research. *ILAR J*, 59(1): 13-17.
- **Migdal C., Serres M. (2011).** Reactive oxygen species and oxidative stress. *Med Sci*, 27(4): 405-412.
- **Mirończuk-Chodakowska I., Witkowska AM., Zujko ME. (2018).** Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, 63(1): 68-78.
- **Mishio T., Houma T., Iwashina T. (2006).** Yellow flavonoids in *centaurea ruthencia* as flower pigments. *Biochemical systematics and ecology*, 34: 180-184.

- **Moneim AA. (2014).** *Azadirachta indica* attenuates cisplatin induced neurotoxicity in rats. *Indian J Pharmacol*, 46: 316-321.
- **Morris G., Anderson G., Dean O., Berk M., Galecki P., Martin-Subero M., Maes M. (2014).** The glutathione system: a new drug target in neuroimmune disorders. *Molecular Neurobiology*, 50(3):1059-1084.
- **Mouffouk C., Mouffouk S., Hambaba L., Haba H., Mouffouk S. (2019).** Evaluation of cytotoxic Effect, anticholinesterase, antioxidant, antiarthritic and antibacterial activities of the Algerian species *Scabiosa stellata L.* *The Eurasia Proceedings of Science Technology Engineering and Mathematics*, 8:1-11.
- **Mrduljaš N., Krešić G., Bilušić T. (2017).** Polyphenols: Food Sources and Health Benefits. U: Chavarri Hueda, M. *Functional Food - Improve Health through Adequate Food*. Rijeka. In Tech Open, str. P: 23-41.
- **Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., V. Böhm V. (2010).** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 992-999.
- **Munro D., Banh S., Sotiri E., Tamanna N., Treberg JR. (2016).** The thioredoxin and glutathione-dependent H₂O₂ consumption pathways in muscle mitochondria: Involvement in H₂O₂ metabolism and consequence to H₂O₂ efflux assays. *Free Rad Biol Med*, 96: 334-346.

N

- **Nabavi SM., Nabavi SF., Alinezhad H., Zare M., Azimi R. (2012).** Biological activities of flavonoid-rich fractions of *Eryngium Caucasicum Trautv.* *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 16(3): 81-87.
- **Naoi M., Shamoto-Nagai M., Maruyama W. (2019).** Neuroprotection of multifunctional phytochemicals as novel therapeutic strategy for neurodegenerative disorders: antiapoptotic and antiamyloidogenic activities by modulation of cellular signal pathways. *Future Neurology*, 14(1).
- **Ncir M., Saudi M., Sellami H., Rahmouni F., Lahyani A., Makni Ayadi F., El Feki A., Allagui MS. (2017).** *In vitro* and *in vivo* studies of *Allium sativum* extract against deltamethrin-induced oxidative stress in rats brain and kidney. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124(3): 207-217.

- **Nemati Z., Barzegar R., Khosravinezhad M., Talebi E., Safaei H.R. (2017).** Chemical composition and antioxidant activity of Shirazi *Thymus vulgaris* essential oil. *Advanced Herbal Medicine*, 3(2): 26-32.
- **Nimse SB., Pal D. (2015).** Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35): 27986-28006.
- **Noreen H., Semmar N., Farman M., Mc Cullagh JSO. (2017).** Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*. *Asian Pac J Trop Med*, 10(8):792-801.

O

- **O'Dwyer PJ., Stevenson JP., Johnson SW. (2000).** Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs*, 59(4):19-27.
- **Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979).** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95:351-358.
- **Orhan B., Yalcin S., Nurlu G., Zeybek D., Muftuoglu S. (2004).** Erythropoietin against cisplatin-induced peripheral neurotoxicity in rats. *Med Oncol*, 21(2):197-203.
- **Owoeye O., Onwuka SK. (2015).** Tomato pomace powder ameliorated cisplatin-induced microanatomical alterations in brain of Wistar rats. *Int. J. Biol. Chem. Sci*, 9(1): 1-11.
- **Ozcan A., Ogun M. (2015).** Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *In: Gowder SJT, ed. Basic principles and clinical significance of oxidative stress.* InTech.
- **Öztürk M., Duru ME., Kivrak Ş., Mercan-Doğan N., Türkoglu A., Özler MA. (2011).** *In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food Chem Toxicol*, 49(6):1353-1360.

P

- **Pace A., Savarese A., Picardo M., Maresca V., Pacetti U., Del Monte G., Biroccio A., Leonetti C., Jandolo B., Cognetti F., Bove L. (2003).** Neuroprotective effect of vitamin E supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 21(5), 927-931.

- **Palipoch S., Koomhin P. (2015).** Oxidative stress-associated pathology: a review. *Sains Malaysiana*, 44 (10):1444-1446.
- **Pascoe JM., Roberts JJ. (1974).** Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds- I: DNA interstrand cross linking and cytotoxic properties of platinum (II) compounds. *Biochem Pharmacol*, 23(91): 1345-1357.
- **Pearce A., Haas M.,Viney R., Pearson SA., Haywood P., Brown C., Ward R. (2017).** Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. *PLoS ONE*, 12(10).
- **Peng Y., Li J., Zhu L. (2019).** Cancer and non-coding RNAs. *Nutritional Epigenomics*. P: 119-132.
- **Peres LA., da Cunha AD Jr. (2013).** Acute nephrotoxicity of cisplatin: molecular mechanisms. *J Bras Nefrol*, 35(4):332-40.
- **Phang CW., Sri-Nurestri AM., Halijah I. (2013).** Antioxidant potential, cytotoxic activity and total phenolic content of *Alpinia pahangensis* rhizomes. *BMC Complement Altern Med*, 13(243).
- **Phaniendra A., Jestadi DB., Periyasamy L. (2014).** Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1):11-26.
- **Piccolella S., Pacifico S. (2015).** Plant-Derived Polyphenols. *Advances in Molecular Toxicology*. P: 161-214.
- **Pick M., Perry C., Lapidot T., Guimaraes-Sternberg C., Naparstek E., Deutsch V., Soreq H. (2006).** Stress-induced cholinergic signaling promotes inflammation-associated thrombopoiesis. *Blood*, 107(8): 3397-3406.
- **Piechota-Polanczyk A., Fichna J. (2014).** The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Pharmacol J. Naunyn-Schmiedeberg*, 387(7): 605-620.
- **Pincemail J., Le Goff C., Charlier C., Gillion P., Cheramy-Bien JP., Van Honacker E., Chapelle JP., JO. Defraigne JO. (2009).** Evaluation biologique du stress oxydant Application en routine clinique. *Nutritions & Endocrinologie .Special antioxydant*. P : 16-31.
- **Pisoschi AM., Pop A. (2015).** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97:55-74.

- **Powers SK., Deruisseau KC., Quindry J., Hamilton KL. (2004).** Dietary antioxidants and exercise. *Journal of Sports Sciences*, 22(1):81-94.

Q

- **Quezel P., Santa S. (1963).** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Paris: Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS)*. P: 1016-1032.

R

- **Radi R., Turrens JF., Chang LY., Bush KM., Crapo JD., Freeman BA. (1991).** Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*, 266: 22028-22034.
- **Rahman K. (2007).** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2): 219-236.
- **Rajapakse Mudiyansele Gamini R., Dunuweera Punyakantha S. (2017).** Discovery, chemistry, anticancer action and targeting of cisplatin. *International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research*, 2(3): 65-74.
- **Rang HP., Dale MM., Ritter JM., Moore PK. (2003).** Pharmacology. *Edinburgh New York. Churchill Livingstone*. P: 132.
- **Ranjan N., Kumari M. (2017).** Acetylcholinesterase inhibition by medicinal plants: A Review. *Annals of Plant Sciences*, 6(6): 1640-1644.
- **Rao MNA., Kunchandy E. (1990).** Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int. J. Pharm*, 58: 237-240.
- **Rasband MN. (2015).** Glial Contributions to Neural Function and Disease. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(2):355-361.
- **Rashmi R., Magesh S., Ramkumar KM., Suryanarayanan S., Subbarao MV. (2018).** Antioxidant potential of naringenin helps to protect liver tissue from streptozotocin-induced damage. *Rep Biochem Mol Bio*, 17 (1): 76-84.
- **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med*, 26:1231-1237.
- **Rea P. (2015).** Introduction to the Nervous System. *Essential Clinical Anatomy of the Nervous System*, P: 1-50.

- **Reed E. (2006).** Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin. In: Chabner BA, Longo DL (eds). *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice 4th Edn.* Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia. P: 332-343.
- **Ribas V., García-Ruiz C., Fernández-Checa JC. (2014).** Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol*, 1(5):151.
- **Rocha C., Silva M., Quinet A., Cabral-Neto J., Menck C. (2018).** DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics*, 73(1).
- **Rodríguez-García, Sánchez-Quesada, Gaforio J. (2019).** Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: an updated review of human studies. *Antioxidants*, 8(5):137.
- **Rodriguez-Menendez V., Gilardini A., Bossi M., Canta A., Oggioni N., Carozzi V., Tremolizzo L., Cavaletti G. (2008).** Valproate protective effects on cisplatin-induced peripheral neuropathy: an *in vitro* and *in vivo* study. *Anticancer Res*, 28(1A): 335-342.
- **Romano N., Federici M., Castaldi A. (2019).** Imaging of cranial nerves: a pictorial overview. *Insights into Imaging*, 10(1).
- **Roostaei T., Nazeri A., Sahraian MA., Minagar A. (2014).** The human cerebellum: a review of physiologic neuroanatomy. *Neurol Clin*, 32(4):859-869.
- **Rosângela F.F de Araújo, Danyelly Brunaska GM., Maria Amélia C.S.M. Borba. (2016).** Oxidative Stress and Disease. In: *A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2*. P: 186-199.
- **Rotruck JT., Pope Al., Ganther HE., Swanson AB., Hafeman DG., Hoekstra WG. (1973).** Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179:588-90.
- **Rucker R. (2015).** Reactive oxygen species: production, regulation, and essential functions. *Antioxidants in Health and Disease*. 1st Edition. P: 3-22.
- **Russell EG., Cotter TG. (2015).** New Insight into the Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cellular Signal-Transduction Processes. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 319: 221-254.

S

- **Saha M., Hasan S., Akter R., Hossain M., Alam M., Alam M., Mazumder M. (2008).** *In vitro* free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of *Mimusops elengi* Linn. *Bangladesh j vet med*, 6(2):197-202.
- **Sahiner UM., Birben E., Erzurum S., Sackesen C., Kalayci O. (2018).** Oxidative stress in asthma: part of the puzzle. *Pediatric Allergy and Immunology*, 29(8):789-800.
- **Salvayre R., Auge N., Nègre-Salvayre A. (2003).** Rôle de l'oxydation dans la genèse et la regressiondel'athérosclérose. *Chapman, Eds. Masson: Paris. P: 269-290.*
- **Santos-Sánchez FN., Salas-Coronado R., Villanueva-Cañongo C., Hernández-Carlos B. (2019).** Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants*. P: 1-28.
- **Schmidt CE., Baier Leach J. (2003).** Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5(1): 293-347.
- **Sedlak J., Hanus L. (1982).** Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. *Endocrinol Exp*, 16 (2): 103-109.
- **Seghiri R., Boumaza O., Mekkiou R., Benayache S., Mosset P., Quintana J., Estévez F., León F., Bermejo J., Benayache F. (2009).** A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochem Lett*, 2:114-118.
- **Seleem D., Pardi V., Murata RM. (2017).** Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-Candida albicans activity *in vitro*. *Archives of Oral Biology*, 76:76-83.
- **Sharma HS., Menon P., Lafuente JV., Muresanu DF., Tian ZR., Patnaik R., Sharma A. (2014).** Development of *in vivo* drug-induced neurotoxicity models. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10(12):1637-1661.
- **Sharma MK., Kumar M., Kumar A. (2005).** Protection against mercury-induced renal damage in Swiss albino mice by *Ocimum sanctum*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 19(1): 161-167.
- **Sharma N. (2014).** Free Radicals, Antioxidants and Disease. *Biology and Medicine*, 6(3): 2-6.

- **Sherwood Lauralee. (2006).**Physiologie Humaine .Tomson Brooks. 2éme édition. P: 110-141.
- **Siddik ZH. (2003).** Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47):7265-7279.
- **Sims NR., Nilsson M., Muyderman H. (2004).** Mitochondrial glutathione: a modulator of brain cell death. *J Bioenerg Biomembr*, 36: 329-333.
- **Singh L., Aldosary S., Saeedan AS., Ansari MN., Kaithwas G. (2018).** Prolyl hydroxylase 2: a promising target to inhibit hypoxia-induced cellular metabolism in cancer cells. *Drug Discov Today*, 23(11): 1873-1882.
- **Soleimani SMA, Ekhtiari H., Cadet JL. (2016).** Drug-induced neurotoxicity in addiction medicine: From prevention to harm reduction. *Prog Brain Res*, 223:19-41.
- **Spencer PS., Lein PJ. (2014).** Neurotoxicity. *Encyclopedia of Toxicology. Third Edition*. P: 489-500.
- **Starobova H., Vetter I. (2017).** Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10:174.
- **Stojiljkovic N., Ilic S., Veljkovic M., Todorovic J., Mladenovic M. (2018).** α -Tocopherol reduces morphological changes and oxidative stress during gentamicin-induced acute renal failure. *Bull Exp Biol Med*, 164: 442-445.
- **Szewczyk A., Wojtczak L. (2002).** Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev*, 54: 101-127.

T

- **Tabassum N1., Qazi MA. , Shah A., Shah MY. (2010).** Curative potential of kashni (*Cichorium intybus* linn) extract against carbon tetrachloride induced hepatocellular damage in rats. *Pharmacology online*, 2: 971-978.
- **Tacka KA., Dabrowiak JC., Goodisman J., Penefsky HS., Souid AK. (2004).** Effects of cisplatin on mitochondrial function in Jurkat cells. *Chem Res Toxicol*, 17: 1102-1111.
- **Tanase C., Cosarcă S., Muntean DL. (2019).** A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules*, 24(6):1182.
- **Tarhoni MH., Vigneswara V., Smith M., Anderson S., Wigmore P., Lees J., Ray DE., Carter WG. (2011).** Detection, quantification, and microlocalisation of targets

- of pesticides using microchannel plate autoradiographic imagers. *Molecules*, 16:8535-8551.
- **Tel-Çayan G., Apaydın M., Duru ME., Öztürk M. (2011).** Antioxidant and cholinesterase inhibition activities of three *Tricholoma* species with total phenolic and flavonoid contents: The edible mushrooms from anatolia. *Food Anal Methods*, 5(3):495-504.
 - **Tel-Çayan G., Deveci E., Çayan F., Duru ME. (2018).** Comparative assessment of phytochemical composition, antioxidant and anticholinesterase activities of two Basidiomycota Truffle Fungi from Turkey. *Marmara Pharm J*, 22 (1): 59-65.
 - **Teleanu D., Chircov C., Grumezescu A., Teleanu R. (2019).** Neurotoxicity of nanomaterials: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials*, 9(1): 96.
 - **Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M. (2005).** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (*Lamiaceae*). *Food Chemistry*, 90(3): 333-340.
 - **Therond P. (2006).** Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6): 383-389.
 - **Tietbohl LAC., Oliveira AP., Esteves RS., Albuquerque RDDG., Folly D., Machado FP., Corrêa AL., Santos MG., Ruiz ALG., Rocha L. (2017).** Antiproliferative activity in tumor cell lines, antioxidant capacity and total phenolic, flavonoid and tannin contents of *Myrciaria floribunda*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 89(2): 1111-1120.
 - **Topçu G., Ay M., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M., Ulubelen A. (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3): 816-822.
 - **Tortora GJ., Derrickson B. (2006).** Principes d'anatomie et physiologie. *Biological Sciences. Text books. 4eme édition.* P: 430-556.
 - **Townsend DM., Deng M., Zhang L., Lapus MG., Hanigan MH. (2003).** Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*, 14:1-10.
 - **Tresserra-Rimbau A., Lamuela-Raventos RM., Moreno JJ. (2018).** Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol*, 156: 186-195.

- **Trifa W., Akkal S., Lefahal M., Benmekhebi L., Khennouf S. (2020).** Preliminary screening of *Nicotiana glauca* extracts for determination of antioxidant activity by different methods. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 33(1): 32-37.
- **Tuncer S., Dalkilic N., Dunbar MA., Keles B. (2010).** Comparative Effects of Alpha Lipoic Acid and Melatonin on Cisplatin-Induced Neurotoxicity. *Int J Neurosci*, 120: 655-663.
- **Turan MI., Cayir A., Cetin N., Suleyman H., Turan IS., Tan H. (2014).** An investigation of the effect of thiamine pyrophosphate on cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage in rat brain tissue compared with thiamine: Thiamine and thiamine pyrophosphate effects on cisplatin neurotoxicity. *Hum Exp Toxicol*, 33(1): 14-21.
- **Turrens JF. (2003).** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552: 335- 344.
- **Tusevski O., Kostovska A., Iloska A., Trajkovska L., Simic S. (2014).** Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Cent Eur J Biol*, 9(9): 888-900.

U

- **Urso MI., Clarkson PM. (2003).** Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189:41-54.

V

- **Velavan Sivanandham. ((2011).** Free radicals in health and diseases, a mini review. *Pharmacologyonline*, 1: 1062-1077.
- **Vergely C., Rochette L. (2003).** Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. *Médecine Thérapeutique Cardiologique*, 1(3):131-139.
- **Vichai V., Kirtikara K. (2006).** Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3):1112-1116.
- **Vindhya K., Leelavathi S. (2015).** Evaluation of antioxidant properties and total phenolic content of *Gardenia gummifera* Linn. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 32(1): 255-261.

W

- **Waseem M., Parvez S. (2013).** Mitochondrial dysfunction mediated cisplatin induced toxicity: Modulatory role of curcumin. *Food and Chemical Toxicology*, 53: 334-342.
- **Webb WG. (2017).** Organization of the Nervous System I. *Neurology for the Speech-Language Pathologist*. P: 13-43.
- **Widmaier EP., Hershel R., Srang KT. (2013).** Physiologie Humaine. *Le mécanisme du fonctionnement de l'organisme, Vander, 6 ème édition*. P:170-183.
- **Witter L., De Zeeuw CI. (2015).** Regional functionality of the cerebellum. *Curr Opin Neurobiol*, 33:150-155.

Y

- **Yadav RS., Sankhwar ML., Shukla RK., Chandra R., Pant AB., Islam F., Khanna VK. (2009).** Attenuation of arsenic neurotoxicity by curcumin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 240: 367-376.
- **Yahfoufi N., Alsadi N., Jambi M., Matar C. (2018).** The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, 10(11):1618.
- **Yang Z., Schumaker LM., Egorin MJ., Zuhowski GE., Guo Z. Cullen JK. (2006).** Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin Cancer Res*, 12(9): 5817-5825.
- **Yesilada E., Honda G., Sezik E., Tabata M., Fujita T., Tanaka T., Takeda Y., Takaishi Y. (1995).** Traditional medicine in Turkey, Folk medicine in inner Taurus Mountains. *J Ethnopharmacol*, 46: 133-152.
- **Young A., Lowe, G. (2018).** Carotenoids-antioxidant properties. *Antioxidants*, 7(2): 28.

Z

- **Zajączkowska R., Kocot-Kępska M., Leppert W., Wrzosek A., Mika J., Wordliczek J.(2019).** Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6):1451.
- **Zaouani M., Bitam A., Baz A., Benali Y., Ben-mahdi MH. (2017).** *In vivo* evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of methanolic extract of

- roots of *Centaurea africana* (L.) in topical formulation. *Asian J Pharm Clin Res*, 10(1): 341-346.
- **Zater H., Huet J., Fontaine V., Benayache S., Stévigny C., Duez P., Benayache F. (2016).** Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. *Asian Pac J Trop Med*, 9(6): 554-561.
 - **Zduńska K., Dana A., Kolodziejczak A., Rotsztejn H. (2018).** Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacol Physiol*, 31(6):332-336.
 - **Zeng T., Zhang CL., Zhu ZP., Yu LH., Zhao XL., Xie KQ. (2008).** Diallyltrisulfide (DATS) effectively attenuated oxidative stress-mediated liver injury and hepatic mitochondrial dysfunction in acute ethanol-exposed mice. *Toxicology*, 252: 86-91.
 - **Zengin G., Aktumsek A., Boga M., Ceylan R., Uysal S. (2016).** Essential oil composition of an uninvestigated *Centaurea* species from Turkey: *Centaurea patula* DC. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(2):485-491.
 - **Zhan M., Brooks C., Liu F., Sun L., Dong Z. (2013).** Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology. *Kidney Int*, 83: 568-581.
 - **Zhang H., Go YM., Jones DP. (2007).** Mitochondrial thioredoxin-2/peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*, 465: 119-26.
 - **Zhang L., Cooper AJ., Krasnikov BF., Xu H., Bubber P., Pinto JT., Gibson GE., Hanigan MH. (2006).** Cisplatin-induced toxicity is associated with platinum deposition in mouse kidney mitochondria *in vivo* and with selective inactivation of the α -ketoglutarate dehydrogenase complex in LLC-PK1 cells. *Biochemistry*, 45(29): 8959-8971.
 - **Zhu J., Carozzi VA., Reed N., Mi R., Marmiroli P., Cavaletti G., Hoke A. (2016).** Ethoxyquin provides neuroprotection against cisplatin-induced neurotoxicity. *Scientific Reports*, 6(1).
 - **Ziad M., Zaher MA., Judeh and Saleh AA. (2019).** Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. *In boock Organic Chemistry*. P: 1-16.
 - **Zsengellér ZK., Ellezian L., Brown D., Horváth B., Mukhopadhyay P., Kalyanaraman B., Parikh SM., Karumanchi SA., Stillman IE., Pacher P. (2012).**

Cisplatin nephrotoxicity involves mitochondrial injury with impaired tubular mitochondrial enzyme activity. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 60(7): 521-529.

Résumés

Résumé

Cette étude vise à étudier les effets protecteurs possibles de l'extrait *n*-BuOH des parties aériennes de la plante *Centaurea maroccana* Ball contre la neurotoxicité induite par le cisplatine chez les souris mâles *Wistar albinos*. Les propriétés neuroprotectrices potentielles du BECM ont été étudiées *in vitro* et *in vivo*. L'étude *in vitro* a montré que l'extrait *n*-butanol de *Centaurea maroccana* possède une forte activité antioxydante après les différents tests, avec les DPPH°, ABTS^{•+}, DMSO alcalin, pouvoir réducteur, β -carotène-acide linoléique et CUPRAC. Le BECM a également démontré une activité antiproliférative élevée contre le C6 (gliome cérébral de *Rattus norvegicus*) et HT29 (adénocarcinome colorectal *Homo sapiens*) par la diminution de la viabilité des deux lignées cellulaires cancéreuses. De plus, le BECM a montré des propriétés neuroprotectrices, par l'inhibition du taux d'acétylcholinestérase (AChE) et de la peroxydation lipidique (LPO) en fonction de la concentration, dans le tissu cérébral. D'autre part, l'étude *in vivo* a montré que l'administration d'une dose unique de CP (8 mg/kg) a induit des lésions cérébrales marquées, se manifestant par une augmentation significative des activités d'AChE et LDH. Le stress oxydatif a également été évident dans le groupe CP par l'augmentation du taux du MDA (résultant de la peroxydation lipidique) et la diminution de la capacité antioxydante totale (TAC), ainsi qu'une diminution remarquable de l'activité des enzymes antioxydants telle que, la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD) et l'enzyme métabolisant le glutathion (glutathion «GSH», glutathion peroxydase «GPx», glutathion S-transférase «GST») dans les fractions cérébrales cytosoliques et mitochondriales. A cet effet, le stress oxydatif cérébral a été accompagné de modifications histologiques multifocales dans le cortex cérébral. Le prétraitement des souris par le BECM (200 mg/kg) pendant 10 jours a significativement amélioré les altérations induites par le CP à travers tous les paramètres mentionnés précédemment, ainsi que l'aspect histologique du tissu cérébral. Intéressant que, le BECM possède une activité neuroprotectrice comparable à celle de la vitamine E (100 mg/kg) dans la plupart des paramètres étudiés. En conclusion, il apparaît que l'extrait *n*-butanol de *Centaurea maroccana* fournit un pouvoir protecteur contre la neurotoxicité induite par le CP qui semble être lié à sa richesse en polyphénols prouvée par l'analyse au LC-MS.

Les mots clés: Cisplatine, *Centaurea maroccana*, Neurotoxicité, Stress oxydative, Activités antioxydantes, Composés phénoliques, Souris *Wistar albinos*.

Abstract

This study aims to investigate the possible protective effects of *n*-BuOH extract of *Centaurea maroccana* Ball aerial parts against CP-induced neurotoxicity in male Wistar albino's mice. The potential neuroprotective properties of BECM were studied *in vitro* and in *in vivo* model. The *in vitro* study revealed that *n*-butanolic extract of *Centaurea maroccana* possessed a strong antioxidant activity by using different assays, namely DPPH^{*}, ABTS⁺, DMSO alkaline, Reducing power, β -carotene-linoleic acid and CUPRAC. Also it has demonstrated a high anti-proliferative activity against C6 (*Rattus norvegicus* brain glioma) and HT29 (*Homo sapiens* colorectal adenocarcinoma) by the decreases viability of both cancer cell lines. Furthermore, BECM exhibited neuroprotective properties, by the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) level and lipid peroxidation (LPO) depending on the concentration in the brain tissue. On the other hand, *the in vivo* study revealed that the administration of a single dose of PC (8 mg/kg; bw) induced a marked brain damage manifested by a significant increases of both AChE and LDH activities. Also oxidative stress was evident in CP-group by the elevation in lipid peroxidation level (MDA), and the decrease in total antioxidant capacity (TAC), as well as a marked decrease in activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and the glutathione metabolizing enzyme (glutathione peroxidase "GPx", glutathione S-transferase "GST") and GSH level in brain mitochondrial and cytosolic fractions. Moreover, the brain oxidative stress was associated with multifocal histological changes in cerebral cortex. While, the pretreatment of mice with BECM (200 mg/kg; bw) for 10 days significantly improved the alterations induced by CP in all the parameters mentioned previously with better recovery in the brain tissue. Interestingly, the BECM achieved neuroprotection comparable to vitamin E (100 mg/kg; bw) in most of the evaluated parameters. Thus, it appears that the *n*-butanolic extract of *Centaurea maroccana* provides a protective potency against CP-induced neurotoxicity which seems to be linked to its richness in polyphenols confirmed by LC-MS analysis.

Key words: Cisplatin, *Centaurea maroccana*, Neurotoxicity, Oxidative Stress, Antioxidant activities, Phenolic compounds, *Wistar albino's* mice.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى البحث في التأثيرات الوقائية المحتملة للمستخلص البيتانولي من الأجزاء الهوائية لنبات *Centaurea maroccana* Ball ضد السمية العصبية التي يسببها دواء السيبلاتين لذكور الفئران سلالة *wistar albinos*، حيث تمت دراسة الخصائص الوقائية العصبية المحتملة للمستخلص البيتانولي في كل من المختبر و الجسم الحي. كشفت الدراسة المختبرية خارج العضوية أن المستخلص البيتانولي لهذه النبتة يمتلك نشاطاً قوياً مضاداً للأكسدة بعد استخدام عدة اختبارات ($DPPH^{\circ}$ ، ABTS ، DMSO القلوية ، القدرة الاختزالية، β -carotene-حمض اللينوليك وCUPRUC)، كما أظهر نشاطاً عالياً مضاداً لانتشار ضد C6 (الورم الدبقي الدماغي لسلالة فئران *Rattus norvegicus*) و HT29 (سرطان القولون والمستقيم للإنسان) عن طريق تقليل سلالة خطي الخلايا السرطانية. بالإضافة إلى ذلك، أظهر المستخلص خصائص لوقاية الأعصاب، عن طريق تثبيط مستوى أستيلكولين إسترز (AChE) وبيروكسيد الدهون (LPO) اعتماداً على التركيز في أنسجة المخ. من جهة أخرى، كشفت الدراسة التي أجريت في الجسم الحي، أن حقن جرعة واحدة من السيبلاتين (8 مجم/كجم ؛ من وزن الجسم) تسبب في تلف ملحوظ في الدماغ يتجلى من خلال زيادة كبيرة في أنشطة كل من AChE و LDH. كما كان الإجهاد التأكسدي واضحاً أيضاً في مجموعة الفئران المعالجة بالسيبلاتين من خلال زيادة مستوى MDA (الناتج عن بيروكسيد الدهون) وانخفاض القدرة الكلية المضادة للأكسدة (TAC) ، فضلاً عن انخفاض ملحوظ في نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة (CAT ، SOD ، GPx ، GST) وانخفاض مستوى GSH ، في الميتوكوندريا والسيروزول. علاوة على ذلك، ارتبط الإجهاد التأكسدي الدماغي بالتغيرات النسيجية متعددة البؤر في القشرة الدماغية. في حين أن المعالجة المسبقة للفئران باستخدام جرعة (200 مجم/كجم؛ من وزن الجسم) من المستخلص البيتانولي لمدة 10 أيام أدت إلى تحسن كبير في التغييرات التي يسببها هذا الدواء في جميع المؤشرات المذكورة سابقاً مع تحسين المظهر النسيجي لأنسجة المخ ، ومن المثير للاهتمام أن هذا المستخلص قد حقق حماية عصبية مماثلة للفيتامين E (هـ) بجرعة (100 ملغم/كجم، من وزن الجسم) في معظم المعايير التي تم تقييمها. نتيجة لذلك، يبدو أن مستخلص البيوتانولي لنبات *Centaurea maroccana* يوفر قوة وقائية ضد السمية العصبية التي يسببها دواء السيبلاتين والتي يبدو أنها مرتبطة بثرانها البوليفينولي الذي أكدّه تحليل LC-MS.

الكلمات المفتاحية: سيبلاتين ، نبات *Centaurea maroccana*، السمية العصبية ، الإجهاد التأكسدي ، النشاط المضاد للأكسدة، المركبات الفينولية، فئران سلالة *Wistar albinos*.

Annexes

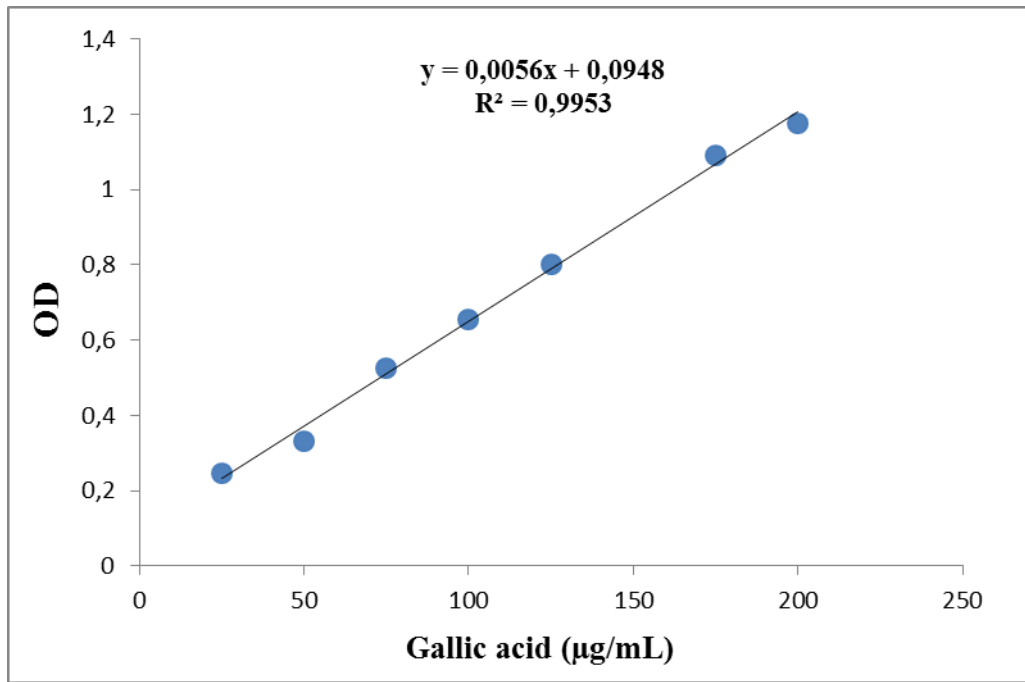


Figure 1 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

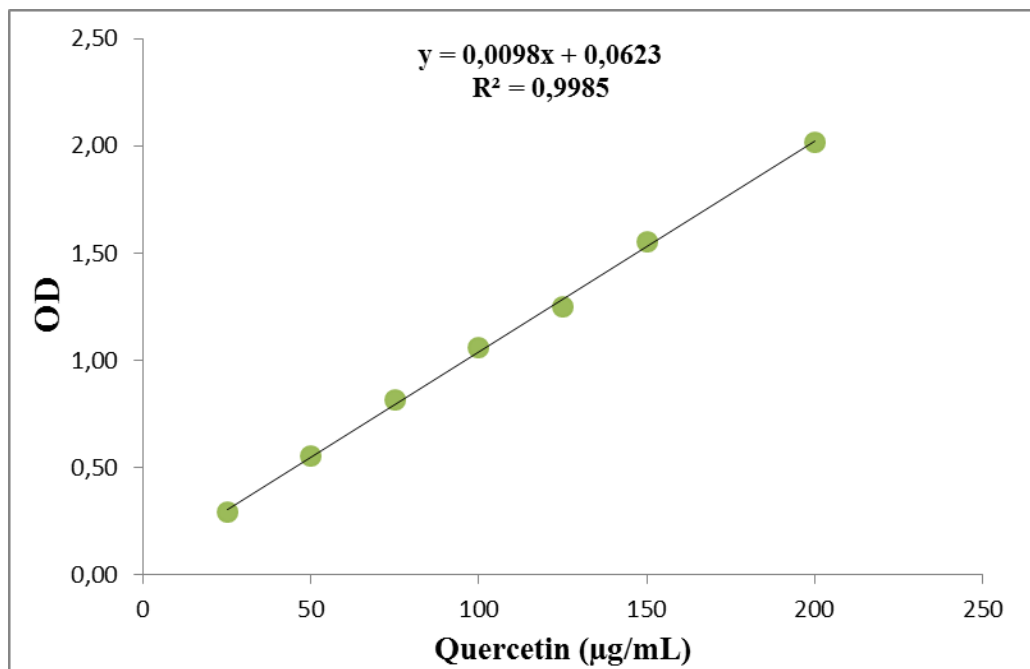


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la quercitrine.

Publication



Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences

Formerly ANNALES UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKLODOWSKA, SECTIO DDD, PHARMACIA

journal homepage: <http://www.curipms.umlib.pl/>



Antioxidant and antiproliferative activities of the *n*-butanol extract of *Centaurea maroccana* Ball aerial parts

IMEN AISSOUS¹, MOUAD BENREBAI¹, ERCAN CACAN², BERKEL CAGLAR², RAMAZAN ERENLER³, SOUAD AMEDDAH¹, SAMIR BENAYACHE⁴, FADILA BENAYACHE⁴, CHAWKI BENSOUICI^{5*} 

¹ Laboratory of Biology and Environment, Faculty of Sciences of Nature and Life, University of Mentouri Constantine 1, Constantine, Algeria

² Tokat Gaziosmanpasa University, Department of Molecular Biology and Genetics, Tokat, Turkey

³ Tokat Gaziosmanpasa University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Tokat, Turkey

⁴ Valorization of Natural Resources Unit, Bioactive Molecules and Physicochemical and Biological Analysis (VARENBIOMOL), University of Mentouri Constantine 1, Constantine, Algeria

⁵ Biotechnology Research Center (CRBt), Ali Mendjli, Constantine, Algeria

ARTICLE INFO

Received 08 May 2020

Accepted 10 October 2020

Keywords:

Centaurea maroccana, phenolic contents, antioxidant activity, anti-proliferative activity.

ABSTRACT

The aim of the present study is to evaluate the total phenolic contents, antioxidant and anti-proliferative activities of the *n*-BuOH extract of *Centaurea maroccana* (BECM). The total phenolic and flavonoid of the butanolic extract of the plant were assessed by using Folin-Ciocalteu and aluminium chloride colorimetric assays, respectively, and the quantitative estimation of total flavonoids and phenols revealed the richness of the extract in these compounds. Antioxidant activity was evaluated using standard lab colorimetric methods, while the anti-proliferative activity was evaluated using sulforhodamine B (SRB) assay against C6 (*Rattus norvegicus* brain glioma) and HT29 (*Homo sapiens* colorectal adenocarcinoma) cell lines. The *n*-butanolic extract of *Centaurea maroccana* showed a strong antioxidant activity through DPPH, ABTS⁺, DMSO alkaline, Reducing power, β -Carotene-linoleic acid and CUPRAC assays. Furthermore, the anti-proliferative activity against C6 and HT29 of *Centaurea maroccana* exhibited a high effect by the decrease in viability of both cancer cell lines. Our results suggest a possible use of *Centaurea maroccana* as a source of natural antioxidant and chemo-preventive agents against cancer.

INTRODUCTION

Antioxidants are inhibitors of the oxidation of an oxidizable substrate while at relatively low concentrations when compared with the substrate [1]. Preventing diseases caused by free radicals and preserving human health are the most vital roles of antioxidants [2]. Antioxidants, especially phenolic compounds, are abundant in several medicinal plants [3], where polyphenols are the most common present secondary metabolites [4]. In recent times, phenolic compounds of natural origin have been investigated, as their indirect antioxidant activity may lead to oxidative stress reduction [5].

About the Mediterranean zone and West Asia, the genus *Centaurea* is represented by approximately 500 species [6]. In Algeria alone, 47 species of this genus are common [7].

In some countries, various species of *Centaurea* plant have been exploited in folk medicine to treat several diseases [8]. This is the outcome of recognizing their significant biological activities [9]. Among these are: antioxidant activity [10], anti-inflammatory [11], and antimicrobial [12] antiviral, antibacterial, and antifungal [13] and cytotoxic [14] activities. In addition, several *Centaurea* species are considered to be valuable sources of bioactive secondary metabolites, particularly, flavonoids and sesquiterpene lactones [15] – which are significant chemotaxonomic indicators [16].

Centaurea maroccana is an endemic herb in the north of Algerian Sahara [17], thus, the aim of the present study was to assess the *in vitro* antioxidant and the anti-proliferative activities of an *n*-BuOH extract of *Centaurea maroccana* (BECM) and to correlate the results with the total phenolic content and the amount of flavonoids through colorimetric methods.

* Corresponding author

e-mail: chawkiislam@yahoo.fr

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Centaurea maroccana was collected from the area of Biskra in the South of Algeria and authenticated by Prof. M. Kaabeche (Biology department, University of Setif, Algeria) according to Quezel and Santa [18]. A voucher specimen (CCM12/04/02) was then deposited in the Herbarium of the Biology Department of Mentouri University of Constantine.

Extraction

Air-dried aerial parts (leaves and flowers, 2700 g) of *Centaurea maroccana* were powdered (slight grinding with controlled temperature, up to 35°C) and macerated at room temperature with MeOH-H₂O (80:20, v/v) three times (24 hours for each time). The filtrates were combined, concentrated under reduced pressure (up to 35°C), diluted in H₂O (1000 ml) under magnetic stirring and maintained at 4°C for one night to precipitate a maximum of chlorophylls. After filtration, the resulting solution was successively extracted with solvents with increasing polarities: chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc) and *n*-butanol (*n*-BuOH). The organic layers were dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum at room temperature to obtain CHCl₃ (12.5 g, yield: 0.46%), EtOAc (20 g, yield: 0.74%) and *n*-BuOH (40 g, yield: 1.48%) extracts. A part of the *Centaurea maroccana n*-BuOH extract (designated BECM) was used in the current study.

Spectral measurements and chemicals used

The measurements and calculations of the activity results were established by using a 96-well microplate reader (PerkinElmer Multimode Plate Reader EnSpire, USA) at the National Center of biotechnology Research. The chemical products and reagents used were: Folin-ciocalteu's reagent (FCR), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), butylated-hydroxyanisole (BHA), Butylatedhydroxytoluene (BHT), α -Tocopherol, β -carotene, linoleic acid, polyoxyethylene sorbitan monopalmitate (Tween-40), Neocuproine, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), Trichloroacetic acid (TCA), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Nitro blue tetrazolium (NTB), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Sulforhodamine B (SRB), and were obtained from Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich GmbH, Stern-heim, Germany), while Sodium Carbonate, Aluminum Nitrate, Iron (III) chloride (FeCl₃), Iron (II) chloride, Sodium bicarbonate, Potassium acetate, were obtained from Biochem Chemopharma. All other chemicals and solvents were of analytical grade.

Determination of total bioactive compounds

Determination of total phenolic content (TPC)

The total phenolic content in the extract was determined spectrophotometry via Folin-Ciocalteu reagent according to the method of Muller *et al.* [19], with a minor modification. In doing so, 1 mg of extract was dissolved in a volume of 1 mL of methanol, then 20 μ L of extract at various concentrations were mixed with 100 μ L of Folin-Ciocalteu reagent diluted

to 1:10 and 75 μ L of sodium carbonate solution (75 g/L) in the wells of a 96-well microplate in the dark at room temperature. After 2 h, the absorbance was measured at 740 nm. A blank is prepared in the same way by replacing the extract with the solvent used (Methanol). Total polyphenols was quantified by employing a gallic acid calibration curve at different concentrations. The total content of phenolic compounds was expressed as micrograms of gallic acid equivalents per milligram of extract (μ g EAG/mg). All bio-activity measurements were carried out using a 96-well microplate reader (Perkin Elmer EnSpire, USA).

Determination of total flavonoid Content (TFC)

The establishment of total flavonoid content of the extract was based on the method described by Topçu *et al.* [20], with slight modifications for determination on a 96-well microplate. Accordingly, 1mg of extract was dissolved in a volume of 1 mL of methanol. Subsequently, 130 μ L (MeOH), 10 μ L of potassium acetate (CH₃COOK) prepared in water and 10 μ L of the aqueous solution of aluminium nitrate (Al(NO₃)₃·9H₂O) was added to a volume of 50 μ L of extract at various dilutions. The absorbance was read at 415 nm, after incubation at room temperature for 40 min. A blank sample was prepared by replacing the reagents with methanol (50 μ L extract + 150 μ L methanol). The quantification of flavonoids was deduced from a calibration range established with quercetin, as a positive control. The results were evaluated as micrograms of quercetin equivalents per milligram of extract (μ g EQ/mg).

Determination of antioxidant activity

DPPH[•] scavenging assay

The free anti-radical activity was determined spectrophotometry via DPPH assay [21]. Briefly, 40 μ L of MeOH extract solution at various concentrations was added to 160 μ L of DPPH (0.1 mM). The reaction mixture was then shaken vigorously and the absorbance of the remaining DPPH was measured at 517 nm after 30 min. BHA and BHT were used as antioxidant standards for activity comparison. The scavenging capability of DPPH radical was calculated using the following equation:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

- Abs control is the absorbance of the reaction containing only the reagents.
- Abs Extract is the absorbance of the reaction containing the reagents and the extract.

The results were given in the form of IC₅₀ value (μ g/mL) corresponding to the concentration of 50% inhibition.

ABTS cation radical Assay

The ABTS^{•+} scavenging activity was derived according to the method of Re *et al.* [22]. The cation radical ABTS was generated by mixing 7 mM of an aqueous solution of ABTS with 2.45 mM of potassium persulfate, the whole was then stored protected from light and at room temperature for 16h before use. The solution obtained was subsequently diluted with ethanol to obtain an absorbance of 0.700±0.025

at 734 nm. After this, 160 μL of ABTS solution was added to 40 μL of methanol extract solution at different concentrations. After 10 min, the absorbance was measured at 734 nm. Methanol was used as a control; BHA and BHT were used as antioxidant standards for the comparison of extract activity.

The scavenging capacity of the ABTS^{•+} was calculated using the following equation:

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ Scavenging effect (\%)} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

Superoxide radical scavenging assay by alkaline DMSO

The scavenging activity of superoxide radicals by alkaline DMSO was obtained by the method of Rao and Kunchandy [23], with the reduction of NBT by superoxide being assessed in the presence and in the absence of extracts. In accomplishing this, the reaction mixture containing NBT (1 mg/mL in distilled water) and 40 μL of extract at various dilutions were added to 130 μL of alkaline DMSO (1 mL of DMSO containing, 5 mM NaOH in 0.1 mL of water) to give a final volume of 200 μL and the absorbance was measured at 560 nm using a microplate reader (Perkin Elmer Enspire, USA). The decrease in absorbance at 560 nm with antioxidants indicates the consumption of the superoxide generated, and the percentage of scanning was calculated using the following formula:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{Control}}}{A_{\text{Sample}}} \times 100$$

Reducing power assay

The reducing power of the tested extract was established according to the method of Aicha Bouratoua [24]. In order to determine the reducing power activity, 10 μL of serial diluted sample were added into a 96 well round-bottomed plate. Following this, 40 μL of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 50 μL of potassium ferricyanide (1%), were added to each well and the plate was incubated at 50°C for 20 min. Finally, 50 μL of TCA (10%) and distilled water (40 μL) and 10 μL of ferric chloride (0.1%) were added into each well in order to measure the reducing power activity. After this, the absorbance was measured in a microplate reader (Perkin Elmer Enspire, USA) at 700 nm. Note: higher absorbance of the reaction mixture indicates greater reducing power.

β -carotene/linoleic Acid bleaching assay

The bleaching activity of β -carotene was evaluated using the method described by Marco [25]. A mass of 0.5 mg of β -carotene dissolved in 1 ml of chloroform was added to a volume of 25 μL of linoleic acid and 200 mg of Tween 40, giving an emulsifying mixture. After evaporation of the chloroform in vacuo, 50 mL of distilled water saturated with oxygen was added with vigorous stirring. The absorbance of the solution was then adjusted between 0.8-0.9 nm. 160 μL of this solution was added to 40 μL of extract solution at different concentrations. Absorbance was measured at 470 nm using a 96-well microplate reader (Perkin Elmer Enspire, USA). The emulsion system was subsequently incubated for 2 h at 50°C, while a blank devoid of β -carotene, was prepared for the background subtraction. BHA and BHT

were used as standards. The bleaching rate (R) of β -carotene was calculated according to the following equation:

$$R = (\ln a/b)/t$$

The antioxidant activity (AA) was derived in terms of percent of inhibition relative to the control, using the following equation:

$$\text{AA (\%)} = \frac{R_{\text{Control}} - R_{\text{Sample}}}{R_{\text{Control}}} \times 100$$

Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

The antioxidant activity by cupric reduction was assessed according to the method of Apak *et al.* [26]. A reaction mixture containing 40 μL of the extract at different concentrations, 50 μL of a copper (II) chloride solution, 50 μL of neocuproin alcoholic solution and 60 μL of ammonium acetate aqueous buffer at pH 7 was placed in each well of a 96-unit microplate. After 30 min, the absorbance was recorded at 450 nm. The results were calculated as $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/mL}$) corresponding to the concentration indicating 0.50 of absorbance. BHA and BHT were used as antioxidant standards.

Determination of *in-vitro* Antiproliferative Activity Cell Culture

C6 (*Rattus norvegicus* brain glioma) and HT29 (*Homo sapiens* colorectal adenocarcinoma) cell lines were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). All media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% Pen/Strep. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The plant extract was dissolved in double distilled water, and stock solutions were filtered using 0.45 μm syringe filters (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany). Stock solutions were kept at 4°C for further use and diluted to desired concentrations with media before treatment.

Cytotoxicity Assay

Sulforhodamine B (SRB) Assay was used to determine percent cell viability of cell lines (C6, HT29) treated with various concentrations of *Centaurea maroccana* extract as described in Vichai and Kirtikara [27]. Briefly, 7500 cells were seeded per well in a 96-well plate (flat bottom). After 24 h incubation, cells were treated with various concentrations of the extract (*n*-butanolic extract of *Centaurea maroccana*) and further incubated for 72h. The cells were then fixed with 10% trichloroacetic acid (TCA) for 1.5 hours at 4°C and washed with ddH₂O for 4 times. Following this, 0.4% SRB dye (dissolved in 1% acetic acid) was added to each well in the dark and the plates were incubated for an additional 30 min at room temperature. After washing with ddH₂O for 4 times, the plates were dried and the dye was solubilized by incubating the cells with 10 mM Tris base solution for 15 minutes on a shaker. Spectrophotometric reading was then performed at 565 nm using a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific, MA, USA). OD values were used for analysis.

Statistical analysis

All data on all activity tests were the average of triplicate analyses. The data were recorded as mean \pm standard deviation (SD). Significant differences between means were determined by Student's *t*-test, *p* values <0.05 were regarded as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenolic content

Phenolic compounds are secondary metabolites that have antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and anti-cancer activities [28]. Research indicates that phenolic content correlates with antioxidant activity [29]. The antioxidant activity of phenolic contents comes about due to their redox properties that permit them to scavenge radicals, metal chelators, singlet oxygen quenchers, hydrogen donors, and reducing agents [30]. Hence, it is important to quantify and assess the effect of the phenolic content on the antioxidant activity in our extract.

In our work, the total phenolic content of BECM was determined using the Folin-Ciocalteu reagent and expressed as micrograms of gallic acid equivalents per milligram of extract. The derived value was calculated from the linear regression equation of a standard curve ($y = 0.0056x + 0.0948$, $R^2 = 0.9953$). Results show that the *n*-butanol extract of *Centaurea maroccana* (BECM), in particular, had high phenolic content at 242.30 ± 1.44 $\mu\text{g GAE/mg}$.

Total flavonoids content

Flavonoids are naturally occurring polyphenols existing in almost all plant resources [31]. The high antioxidant potential of flavonoids lies in their ability to eliminate free radicals and injurious ROS that arise from several cellular activities and lead to oxidative stress [32]. In the present study, the concentrations of flavonoids was determined using the aluminum chloride colorimetric method and was calculated from the linear regression equation of a standard curve of quercetin ($y = 0.0098x + 0.0623$, $R^2 = 0.985$). The quantification is expressed as micrograms quercetin equivalents per milligram of extract. The results reveal that the amount of flavonoids in the *n*-butanol extract of BECM is 23.34 ± 1.28 $\mu\text{g QE/mg}$.

Antioxidant properties

In this study, the antioxidant activity of an *n*-butanol extract of *Centaurea maroccana* was established through by applying six *in-vitro* assays: DPPH radical scavenging, ABTS cation radical scavenging, superoxide radical scavenging assay by alkaline (DMSO), β -carotene-linoleic acid bleaching, cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) and reducing power activity.

The DPPH assay has frequently been used for assessing the anti-oxidative potential of natural products as it is considered a rapid and least cost method [33]. DPPH at room temperature is a stable free-radical that receives an electron/hydrogen radical to become a stable diamagnetic molecule [34]. Antioxidants interact with DPPH, changing its deep violet color to yellow.

The ability of the BECM extract to scavenge the DPPH radical is shown in Table 1. The reference compounds used in this test are BHT and BHA. It can be seen that a significant decrease ($p < 0.05$) in the concentration of DPPH radicals was exhibited by the extract and standards. In our work, the IC_{50} value of BECM extract was found to be 12.09 ± 0.54 $\mu\text{g/mL}$. This figure is higher than that of the BHT standard (22.32 ± 1.19 $\mu\text{g/mL}$), but lower than the IC_{50} of BHA at 5.73 ± 0.41 $\mu\text{g/mL}$. Thus, these results reveal that the *n*-butanol extract has a high DPPH radical scavenging effect that is comparable with the standards.

Table 1. DPPH radical scavenging activity of BECM and the standards butylated hydroxy toluene (BHT) and butylated hydroxyl anisole (BHA)

Concentration $\mu\text{g/mL}$	% Inhibition in DPPH Assay		
	BECM	BHT	BHA
3.125	17.12 \pm 1.57	11.69 \pm 1.88	28.95 \pm 1.16
6.25	26.77 \pm 3.42	22.21 \pm 1.30	54.33 \pm 1.59
12.5	50.35 \pm 3.03	37.12 \pm 1.80	76.76 \pm 1.65
25	84.70 \pm 1.49	52.63 \pm 2.70	84.09 \pm 0.35
50	84.95 \pm 0.23	56.02 \pm 0.53	87.53 \pm 0.82
100	85.76 \pm 0.95	83.60 \pm 0.23	87.73 \pm 0.15
200	86.31 \pm 1.67	87.28 \pm 0.26	88.43 \pm 0.23
IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	12.09 \pm 0.54	22.32 \pm 1.19	5.73 \pm 0.41

The ABTS radical scavenging method is a most dependable method for determining free radicals destruction [35]. The ABTS⁺ chromophore is generated during the reaction of ABTS and potassium persulfate through the transformation of ABTS into a radical cation. The color of this radical cation is blue and absorbs light at 734 nm [36].

Table 2 shows that ABTS⁺ cation radical was significantly inhibited at all concentrations tested. However, at the high concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$, the percentage inhibition by the BECM reached $93.05 \pm 0.65\%$. This outcome is similar to BHT and BHA ($96.68 \pm 0.39\%$ and $95.39 \pm 2.62\%$, respectively). Hence, good ABTS⁺ free-radical scavenging activity was revealed by BECM at $\text{IC}_{50} = 15.13 \pm 0.87$ $\mu\text{g/mL}$, in relation to the standards BHT ($\text{IC}_{50} = 1.29 \pm 0.30$ $\mu\text{g/mL}$) and BHA ($\text{IC}_{50} = 1.81 \pm 0.10$ $\mu\text{g/mL}$).

Table 2. Free radical scavenging activity of *n*-butanol extract of *Centaurea maroccana* on ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic)

Concentration $\mu\text{g/mL}$	% Inhibition in ABTS Assay		
	BECM	BHA	BHT
3.125	12.52 \pm 2.61	83.42 \pm 4.09	59.22 \pm 0.59
6.25	24.68 \pm 1.70	93.52 \pm 0.09	78.55 \pm 3.43
12.5	47.49 \pm 3.09	93.58 \pm 0.09	90.36 \pm 0.00
25	73.77 \pm 2.88	93.63 \pm 0.16	92.18 \pm 1.27
50	90.36 \pm 1.76	93.63 \pm 0.95	93.37 \pm 0.86
100	92.73 \pm 1.42	94.20 \pm 0.90	94.87 \pm 0.87
200	93.05 \pm 0.65	95.39 \pm 2.62	96.68 \pm 0.39
IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	15.13 \pm 0.87	1.81 \pm 0.10	1.29 \pm 0.30

BHT and BHA were used as standards

The superoxide radical is the precursor of more reactive species and is recognized as one of the most damaging species for cellular constituents [37]. The super oxide scavenger capacity of antioxidants present in the extract is determined by the decrease in absorbance at 560 nm. Table 3 shows that the BECM inhibits the formation of the super oxide anion radical generated in vitro by the DMSO alkaline system in a dose-dependent manner. The maximum inhibition of NBt reduction by super oxide (91.57±0.51%) was observed at the high concentration of 200 µg/mL and was comparable to Tannic acid and α-Tocopherol standards (97.54±0.68%, 96.86±1.53%, respectively). Of significance, however, is that the butanolic extract of *Centaurea maroccana* has a stronger super oxide scavenging activity (IC₅₀ = 4.50±0.33) than the two standards used (IC₅₀ = < 3.125 and < 3.125).

Table 3. Superoxide radical scavenging assay by alkaline DMSO of butanolic extract of *Centaurea maroccana*

Concentration µg/mL	% Inhibition in DMSO alcalin assay		
	BECM	Tannic acid	α-Tocopherol
3.125	47.73±4.47	83.58±1	70.09±1.84
6.25	64.83±3.77	88.35±0.61	79.07±2.54
12.5	74.40±2.73	92.66±0.42	85.1±1.36
25	80.66±1.08	94.98±0.85	89.48±0.88
50	85.97±1.03	96.53±0.23	94.76±0.28
100	88.28±0.52	96.95±0.81	96.62±0.29
200	91.57±0.51	97.54±0.68	96.86±1.53
IC ₅₀ µg/mL	4.50±0.33	< 3.125	< 3.125

Tannic acid and α-Tocopherol were used as standards

Reducing power activity is used to assess the potential and the capacity of natural antioxidants to donate electrons [38], and there is a correlation between both the reducing properties and the existence of reductones [39]. These reductones convert yellowed coloured ferric iron (Fe³⁺) to blue-green coloured ferrous iron (Fe²⁺). Hence, reducing activity is determined by measuring the formation of Pearl's Prussian blue at 700 nm. In this study, BECM had the power to reduce ferric ferricianide through increasing the absorbance via concentration. In our experiment, it exhibited an absorbance (1.11±0.09) at the concentration of 50 µg/mL, while the positive references BHT, BHA and Ascorbic Acid exhibited an absorbance of 0.43±0.02, 3.53±0.19, 3.87±0.27, respectively, at the same concentration (Table 4). Thus, this extract (A_{0.50} = 14.19±0.96 µg/mL) has a strong effect compared with BHA (A_{0.50} = >50), BHA (A_{0.50} = 8.41±0.67) and Ascorbic Acid (A_{0.50} = 9.01±1.46).

We used the β-carotene-linoleic acid method to detect the inhibition level of lipid peroxidation [40]. In the β-carotene/linoleic acid system, the oxidation of linoleic acid produces peroxy free radicals owing to the abstraction of a hydrogen atom from the diallylic methylene groups of linoleic acid [41]. The resulting peroxy-free radicals participate in an emulsion attack upon the chromophore β-carotene, resulting in bleaching and loss of yellow color. The presence of antioxidant in this reaction mixture brings about the scavenging of radicals and the suppression of oxidation [28]. The results as shown in Table 5, and demonstrate

that the lipid peroxidation inhibitory ability of the BECM increases significantly (p 0.05) with increasing concentration. Here, the bleaching inhibitory activity of the extract tested at the highest concentration of 200 µg reached a percentage of 83.48±3.97%, whereas the positive standards of BHT reached 95.28±3.25%, while that of BHA reached 99.76±0.91. Thus, BECM has revealed itself to have interesting antioxidant activity in β-carotene bleaching, having an IC₅₀ = 11.08±0.30 µg/mL, in comparison to the standards of BHT and BHA, which are in the following order: 1.05±0.01 µg/mL, 0.90±0.02 µg/mL, respectively.

Table 4. Antioxidant activity of *Centaurea maroccana* by reducing power assay

Concentration µg/mL	Absorbance			
	BECM	BHA	BHT	Ascorbic Acid
0.78125	0.13±0.00	0.09±0.00	0.07±0.00	0.09±0.00
1.5625	0.16±0.00	0.11±0.01	0.08±0.00	0.11±0.00
3.125	0.17±0.02	0.18±0.02	0.10±0.01	0.16±0.01
6.25	0.31±0.02	0.36±0.04	0.13±0.02	0.33±0.04
12.5	0.44±0.02	0.78±0.07	0.22±0.04	0.76±0.16
25	0.71±0.08	1.74±0.07	0.28±0.05	2.02±0.23
50	1.11±0.09	3.53±0.19	0.43±0.02	3.87±0.27
A _{0.50} µg/mL	14.19±0.96	8.41±0.67	>50	9.01±1.46

BHT, BHA and Ascorbic Acid were used as standards

Table 5. Antioxidant activity of *Centaurea maroccana* by the β-carotene-linoleic acid.

Concentration µg/mL	% Inhibition in β-carotene assay		
	BECM	BHA	BHT
3.125	27.99±6.82	84.23±1.14	81.14±0.84
6.25	38.57±4.12	90.11±0.68	86.09±1.04
12.5	51.40±5.36	94.59±0.77	87.52±4.24
25	69.15±2.36	96.09±0.02	91.67±0.52
50	77.19±3.07	97.35±1.08	94.11±0.42
100	83.34±2.28	99.59±0.14	94.41±0.32
200	83.48±3.97	99.76±0.91	95.28±3.25
IC50 µg/mL	11.08±0.30	0.90±0.02	1.05±0.01

BHT and BHA were used as standards

The CUPRAC assay necessitates the use of comparatively standard equipment, where it is applied extensively to determine the antioxidant abilities of plant extracts, and gives quick and repeatable results [42]. The method is founded on the follow-up of the reduction in the augmented absorbance of Neocuproine (Nc) copper (Cu²⁺) [Nc₂-Cu²⁺], wherein the existence of an antioxidant agent reduces the complex (copper-neocuproine). This reaction is measured at 450 nm. In our work, *Centaurea maroccana* extract revealed a strong CUPRAC reducing antioxidant ability with an A_{0.50} value equal to 9.80±0.43 µg/mL. This is similar to the standards used, with BHT at A_{0.50} = 9.62±0.87µg/mL, and BHA at A_{0.50} = 3.64±0.19µg/mL. At 200 µg/mL concentration, roughly same reducing activity was observed via extract and BHA at 3.48±0.13% and 3.93±0.01%, respectively, while BHT was 2.32±0.28% (Table 6).

Table 6. Antioxidant activity by the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay of *Centaurea maroccana* butanolic extract

Concentration µg/mL	Absorbance		
	BECM	BHA	BHT
3.125	0.23±0.00	0.46±0.00	0.19±0.01
6.25	0.39 ±0.06	0.78±0.01	0.33±0.04
12.5	0.59±0.02	1.34±0.08	0.66±0.07
25	1.02 ±0.06	2.36±0.17	1.03±0.07
50	1.76±0.14	3.45±0.02	1.48±0.09
100	2.49±0.29	3.76±0.03	2.04±0.14
200	3.48±0.13	3.93±0.01	2.32±0.28
A _{0.50} µg/mL	9.80±0.43	3.64±0.19	9.62±0.87

In summary, it can be deduced that the high levels of antioxidant activity exhibited by BECM were due to its richness of phenolic components and flavonoids, wherein phenolic components display antioxidant activity and play a significant role in stabilizing lipid peroxidation [43].

Antiproliferative Activity

After performing cytotoxicity screening using SRB Assay, we observed that *n*-butanolic extract of *C. maroccana* (BuOH ext.) significantly decreased percent viability of both cell lines (C6-glioma cell line, HT29-colorectal adenocarcinoma cell line) with increasing concentrations in the range of 50-300 µg/mL (Fig. 1), and with highly similar cytotoxic effect. At 300 µg/mL concentration, cell viability was less than 50% compared to control cells (no treatment) in both C6 and HT29.

We then examined the effect of a combined treatment of BECM and cisplatin, a common chemotherapeutic drug, on these cancer cell lines. The outcome of this was that the combination of cisplatin with BECM treatment caused a slight decrease in cell viability for both cell lines compared to cisplatin treatment alone.

Boxplots showing percent cell viability of cell lines treated with indicated *n*-butanol extract concentrations (BuOH ext.) and/or cisplatin. Cytotoxicity was measured using SRB assay and 5 µM cisplatin was used in these experiments. Blue boxplots indicate combination treatments with cisplatin.

CONCLUSION

In conclusion, the results of this study indicate that the *n*-butanolic extract of *Centaurea maroccana* possesses high total phenolic content and exhibits strong antioxidant activity through scavenging several free radicals. This synergistic antioxidant ability owing to the phenolic compounds present in the plant emphasizes the good correlation among antioxidant properties and phenolic content. Furthermore, we observed that the *n*-butanolic extract of *Centaurea maroccana* significantly decreases the percent viability of both cell lines (C6-glioma cell line, HT29-colorectal adenocarcinoma cell line) with increasing concentration. The present investigation showed that *Centaurea maroccana* can be considered as a source of bioactive compounds that could be used in the

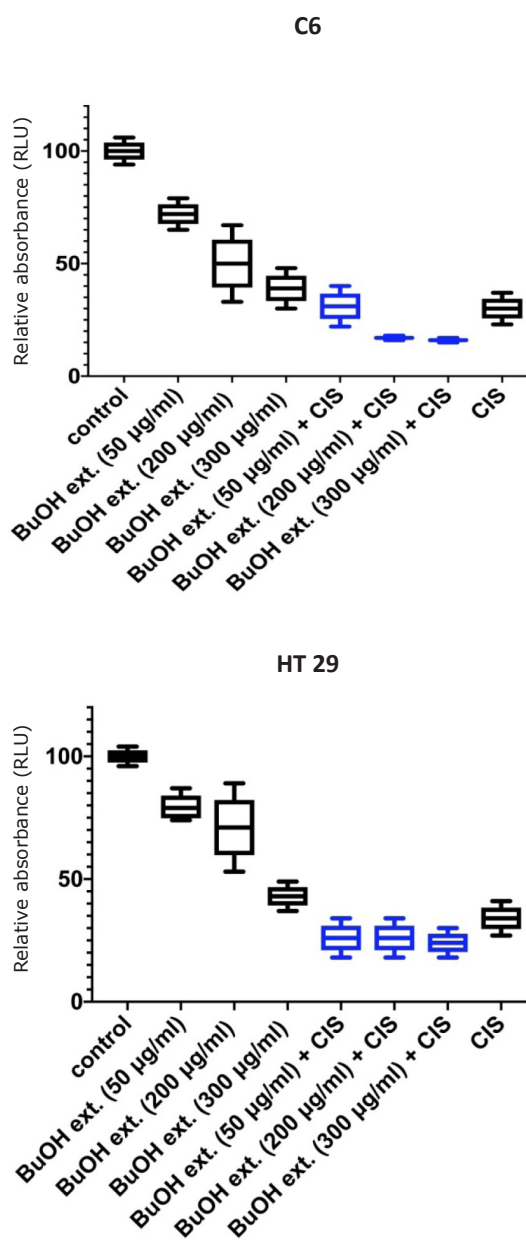


Figure 1. Cytotoxicity of *n*-butanol extract of *Centaurea maroccana* on C6 and HT29 cell lines

pharmaceutical and food industries. Further studies focusing on the isolation and identification of the principle bioactive molecules of antioxidant and antiproliferative activity are, however, needed.

ORCID iDs

Chawki Bensouici  <https://orcid.org/0000-0003-4612-4642>

REFERENCES

- Adebisi OE, Olayemi FO, Ning-Hua T, Guang-Zhi Z. In vitro antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia*. *Beni-Suef Univ. J Basic Appl Sci.* 2017;6(1):10-4.
- Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food Chem Toxicol.* 2013;55:290-6.

3. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 2006;97(4):654-60.
4. Noreen H, Semmar N, Farman M, McCullagh JSO. Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*. *Asian Pac J Trop Med.* 2017;10(8):792-801.
5. Das N, Islam ME, Jahan N, Islam MS, Khan A, Islam MR, Parvin M S. Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14(45).
6. Ayad R, Ababsa ZA, Belfadel FZ, Akkal S, León F, Brouard I, Medjroubi K. Phytochemical and biological activity of Algerian *Centaurea melitensis*. *Int J Med Arom Plants.* 2012;2:151-4.
7. Louaar S, Zellagui A, Gherraf N, Medjroubi K, Derbre S, Seguin E, et al. Antiradical activity of flavonoids from the Algerian Native Plant: *Centaurea microcarpa* Coss. et Dur. *J Biol Act Prod Nat.* 2014;4(3):249-53.
8. Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. species from Turkey flora. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(11):2914-20.
9. Khammar A, Djeddi S. Pharmacological and biological properties of some *Centaurea* species. *Eur J Sci Res.* 2012;84:398-416.
10. Zengin G, Cakmak YS, Guler GO, Aktumsek A. In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia region of Turkey. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(10):2638-41.
11. Erel SB, Karaalp C, Bedir E, Kaehlig H, Glasl S, Khan S, Krenn L. Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. *Pharm Biol.* 2011;49(8):840-9.
12. Güven K, Çelik S, Uysal I. Antimicrobial activity of *Centaurea* species. *Pharm Biol.* 2005;43(1):67-71.
13. Koca U, Özçelik B. Antiviral, antibacterial, and antifungal activities of *Centaurea tchihatcheffii* extracts. *Turk J Pharm Sci.* 2009;6(2):125-34.
14. Erol-Dayi Ö, Pekmez M, Bona M, Aras-Perk A, Arda N. Total phenolic contents, antioxidant activities cytotoxicity of three *Centaurea* species: *C. calcitrapa* subsp. *calcitrapa*, *C. ptoisimopappa* and *C. spicata*. *Free Rad Antiox.* 2011;1(2):31-6.
15. Mezache N, Bendjeddou D, Satta D, Mekkiou R, Benayache S, and Benayache F. Secondary metabolites from *Centaurea lippii*. *Chem Nat Compd.* 2010;46:801-2.
16. Grafakou ME, Djeddi S, Hamel T, Skaltsa H. Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea papposa* (Coss.) Greuter. *Biochem Syst Ecol.* 2018;76:15-22.
17. Bicha S, Bentamene A, Benaissa O, Benayache S, Garcia VP, Leon F, et al. Flavonoid aglycones from *Centaurea maroccana*. *Chem Nat Compd.* 2011;47:105-6.
18. Quezel P, Santa S. *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Paris: Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS); 1963 :1016-32.
19. Muller L, Gnoyke S, Popken AM, Bohm V. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT Food Sci Technol.* 2010;43(6):992-9.
20. Topçu G, Ay A, Bilici A, Sarıkürkcü C, Öztürk M, Ulubelen A. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chem.* 2007;103(3):816-22.
21. Blois MS. Antioxidants determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;26:1199-200.
22. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26 (9-10):1231-7.
23. Kunchandy E, Rao MNA. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int J Pharm.* 1990;58(3):237-40.
24. Bouratoua A, Khalfallah A, Bensouici C, Kabouche Z, AlabdulMagi A, Harakat D, et al. Chemical composition and antioxidant activity of aerial parts of *Ferula longipes* Coss. ex Bonnier and Maury. *Nat Prod Res.* 2017;32(16):1873-80.
25. Marco GJ. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc.* 1968;45:594-8.
26. Apak R, Güçlü K, Ozyürek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem.* 2004;52(26):7970-81.
27. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 2006;1(3):1112-6.
28. Tel-Çayan G, Deveci E, Çayan F, Duru ME. Comparative assessment of phytochemical composition, antioxidant and anticholinesterase activities of two Basidiomycota Truffle Fungi from Turkey. *Marmara Pharm J.* 2018;22 (1):59-65.
29. Tel G, Apaydin M, Duru ME, Öztürk M. Antioxidant and cholinesterase inhibition activities of three *Tricholoma* species with total phenolic and flavonoid contents: The edible mushrooms from anatolia. *Food Anal Methods.* 2011; 5(3):495-504.
30. Phang CW, Sri-Nurestri AM, Halijah I. Antioxidant potential, cytotoxic activity and total phenolic content of *Alpinia pahangensis* rhizomes. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13(1).
31. Nishaa S, Vshnupriya M, Gopalakrishnan VK. Qualitative assessment of ethanolic extract of *Maranta arundinacea* L. rhizome using HPLC. *Int Res J Pharm.* 2013;4(2):76-83.
32. Kalim MD, Bhattacharyya D, Banerjee A, Chattopadhyay S. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of plants used in Unani system of medicine. *BMC Complement Altern Med.* 2010;10(1).
33. Krishnamoorthy M, Sasikumar J, Shamna R, Pandiarajan C, Sofia P, Nagarajan B. Antioxidant activities of bark extract from mangroves, *Bruguiera cylindrica* (L.) Blume and *Ceriops decandra* Perr. *Indian J Pharmacol.* 2011;43(5):557.
34. Ansari AQ, Syed Abrar A, Waheed MA, Sayyed Juned A. Extraction and determination of antioxidant activity of *Withania somnifera* Dunal. *Eur J Exp Biol.* 2013;3(5):502-7.
35. Chandrashekhar HR, Venkatesh P, Arumugam M, Vijayan P. Estimation of total phenols with special emphasis to antioxidant potentials of few *Hypericum* species. *Pharmacologyonline.* 2009; 1:680-7.
36. Lalhminghlui K, Jagetia GC. Evaluation of the free-radical scavenging and antioxidant activities of Chilauni, *Schima wallichii* Korth *in vitro*. *Future Sci OA.* 2018;4(2).
37. Kumar RS, Rajkapoor B, Perumal P. Antioxidant activities of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. using various *in vitro* assay models. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2(4):256-61.
38. Jamuna S, Paulsamy S and Karthika K. Screening of *in vitro* antioxidant activity of methanolic leaf and root extracts of *Hypochoeris radicata* L. (Asteraceae). *J Appl Pharm Sci.* 2012; 02(07):149-54.
39. Saha M, Hasan S, Akter R, Hossain M, Alam M, Alam M, Mazumder M. *In vitro* free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of *Mimusops elengi* Linn. *Bangladesh J Vet Med.* 2008;6(2):197-202.
40. Öztürk M, Duru ME, Kivrak Ş, Mercan-Doğan N, Türkoglu A, Özler MA. *In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(6):1353-60.
41. Laggoun S, Öztürk M, Erol E, Duru ME, Abaza I, Kabouche A, Kabouche Z. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oil of *Mentha spicata* L. from Algeria. *J Mater Environ Sci.* 2016;7:4205-13.
42. Tusevski O, Kostovska A, Iloska A, Trajkovska L, Simic S. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Cent Eur J Biol.* 2014;9(9):888-900.
43. Vindhya K, Leelavathi S. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic content of *Gardenia gummifera* Linn. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2015;32 (1):255-61.

Communications et publications scientifiques

Les résultats de ce présent travail ont été partiellement publiés ainsi qu'ont été présentés sous forme des communications par affiches dans différents congrès internationaux:

Publication:

- ❖ **Imen Aissous**, Mouad Benrebai, Ercan Cacan, Berkel Caglar, Ramazan Erenler, Souad Ameddah, Samir Benayache, Fadila Benayache, Chawki Bensouici. Antioxidant and antiproliferative activities of the *n*-butanol extract of *Centaurea maroccana* Ball aerial parts. Current Issues In Pharmacy and Medical Sciences 2021; 34(1), 5-11.

Communications par affiches:

- ❖ **AISSOUS Imen**, AKAL salah, BENREBAI Mouad, BIOUD Kenza, MENAD Ahmed, BENAYACHE Samir and BENAYACHE Fadila, AMEDDAH Souad. **The chemoprotective effects of *Centaurea marocana* against cisplatin-induced oxidative stress in brain.** VI^{ème} Congrès International de Biotechnologies et Valorisation des Bio-Ressources, organisé par l'AT-BVBR du 20 au 23 Mars 2018 à Tabarka-Tunisie.
- ❖ **AISSOUS Imen**, BIOUD Kenza, AKAL Salah, BENREBAI Mouad, MENAD Ahmed, BENAYACHE Samir and BENAYACHE Fadila, AMEDDAH Souad. **Phenolic content and antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *n*-BuOH extract of *Centaurea maroccana*.** Séminaire International Environnement et Toxicologie (sntox2019) du 18 au 19 Février 2019 à Constantine- Algérie.
- ❖ **AISSOUS Imen**, BIOUD Kenza, AKAL Salah, BENREBAI Mouad, AMEDDAH Souad, BENSOUICI Chawki. **In vitro and in vivo antioxidant capacities of *Centaurea maroccana* extract against cisplatin-induced oxidative stress in mice brain.** VII^{ème} Congrès International de Biotechnologies et Valorisation des Bio-Ressources, organisé par l'AT-BVBR du 20 au 23 Mars 2019 à Tabarka-Tunisie.

- ❖ BIOUD Kenza, AISSOUS Imen, AZZOUZI Djihane, BENREBAI Mouad, MEKKIOU Ratiba, BENAYACHE Samir, BENAYACHE Fadila, AMEDDAH Souad. **Antioxidant activity of butanolic extract of *Centaurea choulettiana* Pomel.** Séminaire International Environnement et Toxicologie (snextox2019) du 18 au 19 Février 2019 à Constantine- Algérie.
- ❖ AISSOUS Imen, BENREBAI Mouad, MENAD Ahmed, AMMEDAH Souad. **Preventive effect of *Centaurea* and vitamin E against cisplatine-induced neurotoxicity in mice.** Journée Portes Ouvertes sur L'Animalerie Le 14 Novembre 2018 à Constantine-Algérie.
- ❖ BIOUD Kenza, AZZOUZI Djihen, BENREBAI Mouad, AISSOUS Imen, AMMEDAH Souad, MEKKIOU Ratiba, BENAYACHE Samir, BENAYACHE Fadila. **Cisplatin- nephrotoxicity attenuation by *Centaurea acoullis* in mice.** Séminaire International des Biotechnologies Constantine (SIBC) du 19-21 Octobre 2015.
- ❖ BIOUD Kenza, AZZOUZI Djihen, BENREBAI Mouad, AISSOUS Imen, MEKKIOU Ratiba, MENAD Ahmed, BENAYACHE Samir, BENAYACHE Fadila, AMEDDAH Souad. **Renoprotective effect of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) leaves on cisplatin-induced renal dysfunction in mice.** VI^{ème} Congrès International de Biotechnologies et Valorisation des Bio-Ressources, organisé par l'AT-BVBR du 20 au 23 Mars 2018 à Tabarka-Tunisie.

Intitulé

L'effet protecteur de l'extrait butanolique de la plante *Centaurea maroccana* contre la neurotoxicité induite par le cisplatine chez les souris.

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3^{ème} cycle

Résumé

Cette étude vise à étudier les effets protecteurs possibles de l'extrait *n-BuOH* des parties aériennes de la plante *Centaurea maroccana* Ball contre la neurotoxicité induite par le cisplatine chez les souris mâles *Wistar albinos*. Les propriétés neuroprotectrices potentielles du BECM ont été étudiées *in vitro* et *in vivo*. L'étude *in vitro* a montré que l'extrait *n*-butanol de *Centaurea maroccana* possède une forte activité antioxydante après les différents tests, avec les DPPH°, ABTS⁺, DMSO alcalin, pouvoir réducteur, β -carotène-acide linoléique et CUPRAC. Le BECM a également démontré une activité antiproliférative élevée contre le C6 (gliome cérébral de *Rattus norvegicus*) et HT29 (adénocarcinome colorectal *Homo sapiens*) par la diminution de la viabilité des deux lignées cellulaires cancéreuses. De plus, le BECM a montré des propriétés neuroprotectrices, par l'inhibition du taux d'acétylcholinestérase (AChE) et de la peroxydation lipidique (LPO) en fonction de la concentration, dans le tissu cérébral. D'autre part, l'étude *in vivo* a montré que l'administration d'une dose unique de CP (8 mg/kg) a induit des lésions cérébrales marquées, se manifestant par une augmentation significative des activités d'AChE et LDH. Le stress oxydatif a également été évident dans le groupe CP par l'augmentation du taux du MDA (résultant de la peroxydation lipidique) et la diminution de la capacité antioxydante totale (TAC), ainsi qu'une diminution remarquable de l'activité des enzymes antioxydants telle que, la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD) et l'enzyme métabolisant le glutathion (glutathion «GSH», glutathion peroxydase «GPx», glutathion S-transférase «GST») dans les fractions cérébrales cytosoliques et mitochondriales. A cet effet, le stress oxydatif cérébral a été accompagné de modifications histologiques multifocales dans cortex cérébral. Le prétraitement des souris par le BECM (200 mg/kg) pendant 10 jours a significativement amélioré les altérations induites par le CP à travers tous les paramètres mentionnés précédemment, ainsi que l'aspect histologique du tissu cérébral. Intéressant que, le BECM possède une activité neuroprotectrice comparable à celle de la vitamine E (100 mg/kg) dans la plupart des paramètres étudiés. En conclusion, il apparaît que l'extrait *n*-butanol de *Centaurea maroccana* fournit un pouvoir protecteur contre la neurotoxicité induite par le CP qui semble être lié à sa richesse en polyphénols prouvée par l'analyse au LC-MS.

Mots clés : Cisplatine, *Centaurea maroccana*, Neurotoxicité, Stress oxydative, Activités antioxydantes, Composés phénoliques, Souris *Wistar albinos*.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté des Science de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine 1.

