

LIRIC - UMR 995

***Neoboutonia melleri var velutina (Prain)*
Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae) :
Evaluation des propriétés
hépatoprotectrice et antioxydante**

THESE

Présentée en vue de l'obtention du
Doctorat de l'Université de Lille 2
Spécialité : Biologie cellulaire

Soutenue publiquement le
25 Novembre 2015

Par

ENDOUGOU EFFA Anne Marie

Devant un jury composé de :

Professeur	ANDRÉJAK Michel,	Rapporteur
Professeur	LE BORGNE Marc,	Rapporteur
Professeur	DESREUMAUX Pierre,	Directeur de thèse
Docteur	HENNEBELLE Thierry,	Examineur

« Les expériences agréables rendent la vie délicieuse. Les expériences pénibles permettent de mûrir. . . »

Anthony de Mello, Quand la conscience s'éveille

« Qui dit chercher dit avoir un but. Mais trouver, c'est être libre, c'est être ouvert à tout, c'est n'avoir aucun but déterminé (...). Le savoir peut se communiquer, mais pas la sagesse. On peut la trouver, on peut en vivre, on peut s'en faire un sentier, on peut grâce à elle, opérer des miracles, mais quant à la dire et à l'enseigner, non, cela ne se peut pas car, la sagesse qu'un sage cherche à communiquer a toujours un air de folie. »

Hermann Hesse, Siddhartha

« Si vous voulez savoir où trouver la grâce, c'est à l'intérieur de vous-même. Si vous cherchez une plus grande sagesse, vous la trouverez en vous-même. . . »

Scott Peck, Le chemin le moins fréquenté

A ma famille...

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans plusieurs laboratoires de recherche et a nécessité la collaboration et l'implication de plusieurs personnes. Comme pour confirmer le proverbe africain qui dit « une seule main ne peut nouer un paquet ». Alors, je tiens à remercier toutes les mains qui, d'une manière ou d'une autre ont participé à l'aboutissement de ce travail. Je pense :

Au Professeur **Pierre Desreumaux** qui a bien voulu m'accueillir dans son unité de recherche (UI 995) à Lille et qui a accepté de diriger cette thèse un « peu particulière ». Je suis arrivé dans votre laboratoire sans aucun background sur les pratiques de biologie cellulaire et moléculaire. En m'accueillant dans l'équipe 1 de l'UI 995, vous m'avez donné l'opportunité d'apprendre et de pratiquer quelques une de ces techniques. Veuillez trouver en ces quelques mots, l'expression de ma profonde gratitude.

Au Professeur **Pierre Kamtchouing** qui, après avoir supervisé mon travail de DEA m'a renouvelé son soutien en acceptant de diriger cette thèse. Je me rappelle encore ce jour où, désespéré, je suis venu vous voir pour vous demander des pistes pour un sujet de thèse. Vous m'avez dit qu'un étudiant en thèse était capable de trouver tout seul un sujet. Votre réponse a suscité en moi, la réflexion qui a fait naître ce sujet de thèse. Merci de croire en nous. Merci pour vos conseils et votre soutien. Merci pour les efforts consentis pour notre formation pratique en histologie au sein du Laboratoire de Physiologie Animale.

Au Professeur **Théophile Dimo** qui n'avait pas hésité à accepter la proposition de codiriger cette thèse ; alors même qu'il n'avait jamais travaillé avec moi. Vous avez toujours été un père pour nous. Votre disponibilité et vos efforts pour faire fonctionner le Laboratoire de Physiologie Animale ont été d'une aide sans pareille dans ce travail. Votre soutien inconditionnel, vos encouragements, vos remarques et suggestions ont toujours été très constructives. Merci d'avoir toujours été là.

A **Laurent Dubuquoy**, mon « quatrième Directeur de thèse ». Tu as suivi toutes les étapes du travail effectué au sein de l'équipe 1 de l'U 995. De la réflexion scientifique à la méthodologie, sans oublier l'administratif. Malgré tes occupations, tu as toujours trouvé du temps pour discuter de mon travail ou pour prêter main-forte au cours des « grosses expérimentations ». Merci de m'avoir accompagné tout au long de ce parcours. Ta disponibilité et ton implication dans ce travail ont été l'une des clés pour son aboutissement. Trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A tous les membres du Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lille 2. Tout particulièrement, Thierry **Hennebelle**, **Vincent Roumy** et **Céline Rivière**. Chacun à sa façon, vous avez apporté votre expertise lorsque je rencontrais des difficultés avec mes extraits. Je n'oublierai pas les solutions pratiques de Thierry Hennebelle lorsque je pensais qu'il n'y avait plus rien à faire. J'oublierai encore moins les astuces techniques toutes particulières de Vincent Roumy pour séparer les composés de mes extraits. Merci Céline, pour ton aide en LC-MS. A **Amin Abedini** et **Ameni Landoulsi**, pour leur aide. A **Sania Mahamodo** qui a été un vrai soutien moral et une amie.

A tous les membres de l'UI 995. Particulièrement ceux de l'équipe 1 aux côtés desquels j'ai beaucoup appris. A **Emilie Gantier** qui m'a formé à la culture des lignées cellulaires et à la technique de qPCR. Tu as été ma principale interlocutrice en technique. A tes côtés, j'ai appris la rigueur et la précision dans la technique. Au-delà du laboratoire, tu m'as donné les clés nécessaires pour l'orientation pratique dans la ville de Lille que je découvrais. A **Madjid Djouina**, qui m'a appris le marquage PCNA en immunohistochimie. Tu as toujours été disponible pour m'apporter ton expérience et ton aide technique. Ton approche pédagogique a facilité la compréhension des techniques que j'ai apprises avec toi. A **Silvia Specca** grâce à qui j'avais pu développer des astuces techniques en culture cellulaire. Les soirées passées avec toi et ta présence tardive au Laboratoire ont été une douce chaleur et une source de motivation. A **Cécile Vignal** et **Mathilde Body-Malapel** qui m'ont toujours apporté leur soutien. Merci Mathilde, de m'avoir aidé à designer mes primers. Merci Cécile, d'avoir toujours été disponible lorsque je te sollicitais. A **Caroline Dubuquoy** qui n'a jamais hésité à me proposer son aide ou à me prêter son matériel. Les boîtes que tu m'avais offertes pour mes lames d'histologie ne pouvaient pas mieux tomber. Merci pour tes bonjours chaleureux. A Emeline **Gorecki** pour son aide technique. Tu as apporté une pierre à l'édifice. A **Nicolas Esquerre**, **Audrey Langlois**, **Anthony Martin Mena**, **François Maggiotto** et **Charbel Chater** avec qui j'ai passé des soirées détentes, ô combien nécessaires lorsqu'on est loin des siens. Merci pour ces soirées et pour votre simplicité.

A tous les membres du Laboratoire de Physiologie Animale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I. Commencer ce travail à vos côtés a été une belle expérience. A **Désiré Dzeufiet** qui est un grand frère pour nous. Merci pour tes conseils et tes encouragements. A **Agathe Fotio Lambou** et **David Emery Tsala** pour leurs conseils et orientations. A **Florence Ngueguim**, **Danielle Claude Bilanda**, **Paulin Nana** et **Tom Esther Ngo Lemba**, merci pour vos encouragements. A **Thierry Bella Dzana**, **Aboubakar Bibi Farouck** et **Antoine Kada Sanda** qui m'ont accompagné lors des dosages des antioxydants au Laboratoire de Physiologie Animale. Vous avez été d'un

soutien incontestable dans la réalisation de ce travail. Un merci tout particulier à toi Thierry pour ta disponibilité. Merci Bibi, pour tes suggestions toujours intéressantes. Merci Antoine, pour ton aide à l'animalerie. A **Pierre Obama** qui a été « mon homme de main ». Merci de m'avoir épaulé en toutes circonstances. A **Germain Taiwe Sotoing, Mireille Metchi, Atsang Akiki, Séfirin Djiogue, Roméo Temdié** et tous ceux que j'aurais oubliés. Votre bonne humeur a rythmé mon quotidien au Laboratoire.

A **Bruno David** pour la précieuse documentation qu'il avait bien voulu me fournir.

A **mes collègues** de l'Université de Douala pour m'avoir soutenu durant mes séjours à l'Université de Lille 2. Votre disponibilité et vos encouragements m'ont permis de réaliser mon travail en toute quiétude. Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A feu **Linux Tsimi**, le « médecin » traditionnel qui a bien voulu me transmettre ses connaissances sur la plante qui a fait l'objet de ce travail. Je remercie également sa famille et tout particulièrement son fils qui a accepté de continuer avec moi, ce que son père avait commencé.

A **ma famille**, les mots ne suffiront pas pour vous exprimer toute ma gratitude et mon affection. Alors, pour vous témoigner ma reconnaissance, je choisis le Silence.

A **mes amis** et tout particulièrement **Samuel Ovassa**. Vous avez été à mes côtés pendant les périodes difficiles. Votre soutien a été l'une des motivations pour terminer ce travail. Merci.

Au **Service de la Coopération et d'Action Culturelle** (SCAC) de l'Ambassade de France au Cameroun. Merci de m'avoir attribué la bourse de mobilité qui m'a permis de réaliser la grande partie de ce travail.

Aux **membres du jury** qui ont bien voulu apporter leur expertise en jugeant ce travail. Merci de participer à son amélioration.

SOMMAIRE

DEDICACE.....	2
REMERCIEMENTS.....	3
SOMMAIRE.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES FIGURES.....	13
RESUME.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUCTION.....	18
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	22
I-1- LES EUPHORBIACEES ET NEOBOUTONIA VELUTINA.....	23
I-1-1- La Famille des Euphorbiacées.....	23
I-1-2- Le Genre <i>Neoboutonia</i>	28
I-1-3- L'espèce <i>Neoboutonia velutina</i>	31
I-2- LE FOIE ET LES HEPATITES.....	33
I-2-1- Le Foie.....	33
I-2-2- Les hépatites.....	40
I-3- LE STRESS OXYDANT- LES ANTIOXYDANTS ET LES HEPATITES.....	45
I-3-1- Le stress oxydant.....	45
I-3-2- Les antioxydants.....	48
I-3-3- Les hépatites - le stress oxydant/nitrosant - les antioxydants.....	51
I-4- QUELQUES MODELES EXPERIMENTAUX DES HEPATITES.....	52
I-4-1- Modèles expérimentaux de l'hépatite virale B et C.....	53
I-4-2- Modèles expérimentaux des hépatites non virales ou toxiques.....	54

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	56
II-1- MATERIEL BIOLOGIQUE	57
II-1-1- Récolte de la plante	57
II-1-2- Cellules et culture cellulaire.....	57
II-1-3- Animaux d'expérimentation.....	58
II-2- PREPARATION DES EXTRAITS	59
II-3- PROFIL PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS DE <i>N. VELUTINA</i>	60
II-3-1- Analyses qualitatives.....	60
II-3-2- Analyses par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) analytique.....	61
II-3-3- Chromatographie Liquide sous Haute Pression.....	64
II-4- EVALUATION DE LA CAPACITE ANTIOXYDANTE <i>IN VITRO</i> DES EXTRAITS DE <i>NEOBOUTONIA VELUTINA</i>	65
II-4-1- Evaluation du pouvoir antioxydant total (TAC).....	65
II-4-2- Dosage des polyphénols totaux : test de Folin-Ciocalteu.....	65
II-4-3- Evaluation du pouvoir réducteur du fer : test de FRAP	66
II-4-4- Evaluation du pouvoir anti-radicalaire au DPPH (1, 1-Diphenyl-2- picrylhydrazyl)	66
II-5- DOSAGE DES MINERAUX, FRACTIONNEMENT ET ISOLEMENT DE QUELQUES COMPOSES DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>N. VELUTINA</i>	68
II-5-1- Dosage des minéraux de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i>	68
II-5-2- Fractionnement de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> -révélation et mise en évidence des fractions anti-radicalaires- isolement de quelques composés.....	68
II-6- PROFIL TOXICOLOGIQUE DES EXTRAITS DE <i>N. VELUTINA</i>	72
II-6-1- Etude de la cytotoxicité des extraits.....	72
II-6-2- Toxicité aiguë <i>in vivo</i> des extraits de <i>N. velutina</i>	76
II-7- ETUDE <i>IN VITRO</i> DE L'EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE HEPATIQUE DES EXTRAITS DE <i>N. VELUTINA</i>	76
II-7-1- Effets des extraits en post-traitement des cellules HepG2 stimulées	76
II-7-2- Effets des extraits en co-traitement des cellules HepaRG et/ou HepG2 stimulées.....	77

II-8- ETUDES IN VIVO DE L'EFFET DES EXTRAITS DE <i>N. VELUTINA</i> EN TRAITEMENT CURATIF DE L'HEPATITE AIGUË INDUITE PAR LE TETRACHLORURE DE CARBONE	78
II-8-1- Effets de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i>	78
II-8-2- Effets de l'extrait à l'éthanol de <i>N. velutina</i>	80
II-9- EVALUATION DES EFFETS DE L'EXTRAIT AQUEUX EN TRAITEMENT PREVENTIF	82
II-9-1- Evaluation des effets de l'extrait aqueux sur l'hépatite aiguë induite par le CCl ₄ chez la souris C57BL/6.....	82
II-9-2- Evaluation des effets de l'extrait aqueux sur l'hépatite aiguë induite par la Concanavalin A (ConA) chez la souris C57BL/6.....	83
II-10- PREPARATION DES HOMOGENATS DE FOIE- EXTRACTION DES ARNm, QUANTIFICATION ET TRANSCRIPTION INVERSE (RT) DES ARNm TOTAUX- QPCR.....	84
II-10-1- Préparation des homogénats 10%.....	84
II-10-2- Extraction, quantification, transcription inverse (RT) des ARN totaux et qPCR.....	84
II-11- ANALYSES HISTOLOGIQUE ET IMMUNOHISTOCHEMIE	86
II-11-1- Analyses histologiques.....	86
II-11-2- Analyse immunohistochimique : Marquage PCNA de la Prolifération cellulaire.....	87
II-12- DOSAGES DES TRANSAMINASES SÉRIQUES- DOSAGE DES PROTÉINES ET DES MARQUEURS DU STRESS OXYDANT DANS LE FOIE.....	88
II-12-1- Dosage des transaminases sériques.....	88
II-12-2- Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford.....	90
II-12-3- Evaluation des paramètres du stress oxydant hépatique.....	92
II-13- ANALYSES STATISTIQUES.....	98
CHAPITRE III : RESULTATS.....	99
III-1- PROFILS PHYTOCHIMIQUES DES EXTRAITS DE <i>N. VELUTINA</i>.....	100
III-1-1- Profils qualitatifs des extraits de <i>N. velutina</i>	100
III-1-2-Profils analytiques en chromatographie sur couche mince (CCM).....	101
III-1-3- Profils chromatographiques des extraits de <i>N. velutina</i> en Chromatographie Liquide sous Haute Pression	102

III-2- CAPACITE ANTIOXYDANTE <i>IN VITRO</i> DES EXTRAITS DE <i>NEOBOUTONIA VELUTINA</i>.....	103
III-2-1- Pouvoir antioxydant total des extraits.....	103
III-2-2- Taux de polyphénols totaux dans les extraits de <i>N. velutina</i>	104
III-2-3- Pouvoir réducteur du fer des extraits de <i>N. velutina</i>	105
III-2-4- Capacité antiradicalaire au DPPH.....	105
III-2-5- Caractérisation de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux.....	107
III-3- FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>N. VELUTINA</i>.....	109
III-3-1- Révélation des composés et mise en évidence des fractions anti-radicalaires par CCM analytique.....	109
III-3-2- Capacité anti-radicalaire au DPPH de la fraction F3.....	110
III-3-3- Profil de la fraction F3 en chromatographie Liquide sous haute pression	111
III-3-4- Sous-fractionnement de la fraction F3 par Chromatographie Liquide sous Moyenne Pression.....	112
III-4- PROFIL TOXICOLOGIQUE DES EXTRAITS DE <i>N. VELUTINA</i>.....	115
III-4-1- Cytotoxicité.....	115
III-4-2- Toxicité aiguë <i>in vivo</i> des extraits de <i>N. velutina</i>	118
III-5- EFFETS DES EXTRAITS DE <i>N. VELUTINA</i> SUR L'INFLAMMATION HEPATIQUE <i>IN VITRO</i>.....	124
III-5-1- Effets de l'extrait aqueux sur l'inflammation hépatique <i>in vitro</i>	124
III-5-2- Effets de l'extrait éthanolique sur l'inflammation hépatique <i>in vitro</i>	129
III-6- EFFETS DES EXTRAITS DE <i>N. VELUTINA</i> SUR L'HEPATITE AIGUË INDUITE PAR LE TETRACHLORURE DE CARBONE.....	131
III-6-1- Effets d'une dose unique de l'extrait aqueux chez les C57BL/6.....	131
III-6-2- Effets d'une double administration de l'extrait aqueux chez les BALB/C.....	137
III-6-3- Effets d'une double administration de l'extrait éthanolique sur les transaminases sériques (ASAT et ALAT).....	143

III-7- EFFETS PREVENTIFS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>N. VELUTINA</i>.....	144
III-7-1- Effets préventifs sur l'hépatite aiguë induite par le CCl ₄	144
III-7-2- Effets préventifs sur l'hépatite aiguë induite par la ConA.....	160
CHAPITRE IV : DISCUSSION.....	164
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	178
REFERENCES.....	181
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	195

LISTE DES ABREVIATIONS

ALD : “Alcoholic Liver Disease”

AH : “Alcoholic Hepatitis”

BHT : Butylated Hydroxytoluene

BSA : “Bovin Serum Albumin”

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CLHP/HPLC : Chromatographie Liquide sous Haute Pression/ “High Pressure Liquid Chromatography”

DMEM : “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”

DMACA : Diméthylamino-cinnamaldehyde

DPPH : 2,2 Diphenyl-1-Picrylhydrazyl

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

ERO/ROS : Espèces Réactives de l’Oxygène/ “Reactive Oxygen Species”

ERN/RNS : Espèces Réactives de l’Azote/ “Reactive Nitrogen Species”

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase

HCC : “Hepatocellular Carcinoma”

HE : Hématoxylin/Eosine

IC₅₀ : Concentration nécessaire pour avoir 50% d’inhibition

LDH : Lactate Deshydrogenase

MTT : 3-[4, 5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium

NAFLD : “Non Alcoholic Fatty Liver Disease”

N. melleri : *Neoboutonia melleri*

N. velutina : *Neoboutonia velutina*

NVH : extrait aqueux de *Neoboutonia velutina*

NVE : extrait éthanolique de *Neoboutonia velutina*

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

PBS : “Phosphate Buffered Salin”

PFA : Paraformaldéhyde

SVR : “Survival Rate”

UV : Ultraviolet

VH (A, B, C, D, E, G) : Virus de l’hépatite (A, B, C, D, E, G)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	: Récapitulatif des révélateurs de plaques de CCM.....	63
Tableau II	: Gradients d'élution des extraits de <i>N. velutina</i> en CLHP.....	65
Tableau III	: Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage du DPPH.....	67
Tableau IV	: Protocole de dosage des transaminases sériques.....	89
Tableau V	: Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage des transaminases.....	90
Tableau VI	: Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage des protéines.....	91
Tableau VII	: Protocole de réalisation de la Courbe d'étalonnage de la catalase.....	92
Tableau VIII	: Protocole de dosage de la catalase dans les échantillons.....	93
Tableau IX	: Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage du MDA.....	96
Tableau X	: Protocole de dosage des nitrites et de réalisation courbe de la courbe d'étalonnage.....	97
Tableau XI	: Récapitulatif des composés supposés bioactifs dans les extraits.....	100
Tableau XII	: Composition minérale de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i>	107
Tableau XIII	: Mortalités observées après administration des extraits de <i>N. velutina</i> en toxicité aiguë.....	119
Tableau XIV	: Récapitulatif des animaux présentant un foie lésé après administration d'une double dose d'extrait aqueux et induction de l'hépatite au CCl ₄	138
Tableau XV	: Effets d'une double administration de l'extrait éthanolique sur les transaminases sériques.....	143
Tableau XVI	: Récapitulatif des animaux présentant un foie lésé après prétraitement à l'extrait aqueux et induction de l'hépatite au CCl ₄	148

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Distribution des espèces du genre <i>Neoboutonia</i>	29
Figure 2 : Photos de <i>Neoboutonia melleri var velutina</i> Prain.....	32
Figure 3 : Positionnement schématique des acini et lobules hépatiques.....	36
Figure 4 : Coupe schématique d'un lobule hépatique.....	37
Figure 5 : Schéma de préparation des extraits totaux de <i>N. velutina</i>	59
Figure 6 : Schéma du fractionnement de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i>	70
Figure 7 : Schéma du sous-fractionnement de la fraction F3 de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i>	72
Figure 8 : CCM analytique des extraits de <i>N. velutina</i> avant et après révélation.....	101
Figure 9 : Profil HPLC des extraits totaux de <i>N. velutina</i>	102
Figure 10 : Pouvoir antioxydant total des extraits de <i>N. velutina</i>	103
Figure 11 : Quantité de polyphénols totaux dans les extraits de <i>N. velutina</i>	104
Figure 12 : Pouvoir réducteur de fer des extraits de <i>N. velutina</i>	105
Figure 13 : Capacité anti-radicalaire au DPPH des extraits de <i>N. velutina</i>	106
Figure 14 : Pouvoir antioxydant total et cinétique d'inhibition du DPPH par l'extrait aqueux.....	108
Figure 15 : Révélation des fractions et mise en évidence des fractions anti- radicalaires.....	109
Figure 16 : Capacité anti-radicalaire au DPPH de la fraction F3 de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i>	110
Figure 17 : Profil HPLC de l'extrait aqueux total et de sa fraction F3.....	111
Figure 18 : Profil HPLC des sous-fractions rassemblées de F3.....	113
Figure 19 : Profil HPLC et mise en évidence de la sous-fraction anti-radicalaire.....	114
Figure 20 : Effets des extraits de <i>N. velutina</i> sur les membranes cellulaires.....	115
Figure 21 : Effets des extraits de <i>N. velutina</i> sur la viabilité cellulaire.....	117
Figure 22 : Effets des extraits de <i>N. velutina</i> sur l'apoptose cellulaire	118
Figure 23 : Effets de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur le poids corporel	121
Figure 24 : Effets de l'extrait éthanolique de <i>N. velutina</i> sur le poids corporel	122

Figure 25 : Effets des extraits de <i>N. velutina</i> sur le poids relatif des organes	123
Figure 26 : Effets anti-TNF α et anti-IL8 de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur les cellules HepG2.....	125
Figure 27 : Expression de TNF α sur les cellules HepG2 co-traitées avec du TNF α /IFN γ et l'extrait aqueux	126
Figure 28 : Effets anti-inflammatoires hépatiques de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur les cellules HepaRG	128
Figure 29 : Effets de l'extrait éthanolique de <i>N. velutina</i> en post-traitement sur les cellules HepG2.....	129
Figure 30 : Effets de l'extrait éthanolique de <i>N. velutina</i> en co-traitement sur les cellules HepG2.....	131
Figure 31 : Effets d'une dose unique de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur les transaminases sériques.....	132
Figure 32 : Effets d'une dose unique de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur l'expression de TNF α , IL-1 β , iNOS, COX-2 et IL-6.....	133
Figure 33 : Effets d'une dose unique de l'extrait aqueux sur les lésions hépatiques induites par le CCl $_4$ (HEx100).....	134
Figure 34 : Effets d'une dose unique de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur l'expression de quelques chimiokines et le récepteur CXCR-2.....	135
Figure 35 : Effets d'une dose unique de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur l'expression de la catalase, le GPX-1, la SOD-1 et la SOD-3.....	136
Figure 36 : Effets d'une double dose de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur les transaminases sériques.	137
Figure 37 : Effets d'une double dose de l'extrait aqueux sur les lésions hépatiques induites par le CCl $_4$ (HE x 100).....	139
Figure 38 : Effets d'une double dose de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur les nitrites et le malondialdéhyde (MDA).	140
Figure 39 : Effets d'une double dose de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur le glutathion (GSH), l'activité de la superoxyde dismutase totale (SODt) et de la catalase	142
Figure 40 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur les transaminases sériques.	145
Figure 41 : Effets préventifs de l'extrait aqueux ou de la méthylprednisolone sans induction de l'hépatite (HE x 5 ; HE x 100).....	146

Figure 42 : Effets d'une administration préventive de l'extrait aqueux sur les lésions hépatiques induites par le CCl ₄ (HE x 5 ; HE x 100).....	147
Figure 43 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur TNF α , IL1- β , IL-6, iNOS et COX-2.....	149
Figure 44 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur la prolifération cellulaire.....	150
Figure 45 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur l'expression du TGF β , PDGFB, HGF et α SMA	152
Figure 46 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur l'expression de CXCR-2, CXCL-1/KC, CXCL-2/MIP-2 et CXCL-5/LIX.	154
Figure 47 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur l'expression de la SOD-1, SOD-2, SOD-3, CATALASE et GPX-1.....	156
Figure 48 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur la peroxydation lipidique (MDA) et quelques antioxydants.....	158
Figure 49 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur Bcl-2 et Bax.....	159
Figure 50 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur les transaminases sériques après injection de la ConA.	160
Figure 51 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux sur les lésions hépatiques induites par la Concanavalin A (HE x 100).....	161
Figure 52 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur le TNF α , IL1- β , IFN γ et IL-6 après induction de l'hépatite à la ConA.....	162
Figure 53 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de <i>N. velutina</i> sur la peroxydation lipidique (MDA) et quelques antioxydants après injection de la ConA	163

RESUME

L'hépatite est une inflammation du foie pouvant être causée par divers agents. Elle reste un problème de santé publique majeur dans le monde, compte tenu du coût de plus en plus élevé des médicaments. Une meilleure compréhension des mécanismes d'action des plantes médicinales apparaît intéressante pour développer des traitements alternatifs. L'objectif de cette étude était d'évaluer les propriétés hépatoprotectrice, puis d'identifier les mécanismes qui pourraient sous-tendre l'action de *Neoboutonia velutina*, une plante médicinale camerounaise.

Les extraits aqueux (NVH) et éthanolique (NVE) de *N. velutina* ont été préparés, se référant à la préparation traditionnelle. Les analyses phytochimique et toxicologique ont été effectuées et le potentiel antioxydant évalué *in vitro* et *in vivo*. L'effet anti-inflammatoire des deux extraits a été évalué sur les cellules et chez la souris. L'hépatite aiguë a été induite par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) ou la Concanavalin A (ConA), chez la souris qui recevait ou non différentes doses d'extrait par gavage. L'extrait aqueux a été fractionné pour l'identification des composés bioactifs.

NVE contiendrait des stérols et polyterpènes. Cet extrait a présenté une capacité anti-radicalaire meilleure que celle de NVH. Il s'est avéré plus toxique que NVH ; ce qui a limité nos investigations sur cet extrait. En revanche, NVH contiendrait des saponines et glycosides et a révélé une très faible toxicité. De plus, un remarquable effet protecteur de NVH a été noté contre les dommages causés par le CCl₄. Cet effet protecteur s'est traduit par une diminution dose-dépendante et significative des transaminases sériques et une importante diminution des lésions hépatiques. Ceci, associé à la capacité anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo*. En outre, un composé anti-radicalaire a été isolé de NVH. Par ailleurs, dans le modèle ConA, NVH n'a présenté qu'un faible effet protecteur. Ce qui suggère une efficacité sélective de cet extrait.

En conclusion, nous avons démontré dans notre étude, un effet hépatoprotecteur de NV à travers l'extrait aqueux qui a présenté un effet hépatoprotecteur modèle dépendant. Cet effet semble être médié au moins, par la capacité anti-radicalaire de la plante. Nos résultats présentent ainsi les premiers arguments en faveur de l'utilisation traditionnelle de NV contre les hépatites. Des études plus poussées permettraient de mieux comprendre les mécanismes d'action de cette plante et d'exploiter au mieux son potentiel thérapeutique, sans risque de toxicité. Ainsi, bien que présentant une toxicité, l'extrait éthanolique qui mime la préparation traditionnelle a révélé un potentiel thérapeutique qui pourrait être très intéressant à très faibles doses.

Mots clés : *Neoboutonia melleri* var *velutina*, hépatites, traitement, antioxydant.

ABSTRACT

Hepatitis is a liver inflammation caused by different agents. It remains a public health problem worldwide since current treatment methods are increasingly expensive. Medicinal plants are known as an important source of new molecules. A better knowledge of these natural resources appears interesting to develop alternative treatments. The aim of this study was then to evaluate the hepatoprotective effect of *Neoboutonia velutina* (NV), a Cameroonian medicinal plant, and decipher underlying mechanisms.

NV aqueous (NVH) and ethanol (NVE) extracts have been prepared referring to the traditional use. Phytochemical and toxicological analyses were performed *in vitro* and *in vivo*. Similarly, extracts antioxidant and antiinflammatory potential was assessed on cells (or not) and in mice. Acute hepatitis was induced with carbon tetrachloride (CCl₄) or Concanavalin A (ConA), in mice receiving or not different extracts doses by gavage. NVH fractionation was done to identify active compounds.

NVE was containing sterols and polyterpens. Though it displayed a high radical scavenging capacity compared to NVH, it appeared more toxic. Thus, for assays, priority was given to NVH, containing saponins and glycosides. NVH showed a radical scavenging capacity with a very low toxicity. It remarkably protected mice from CCl₄-induced liver injuries. As shown by significant dose dependent transaminases serum level decrease and liver injury important limitation. These, associated with NVH anti-inflammatory capacity. Furthermore, NVH fractionation led to a radical scavenging compound isolation. Otherwise, in ConA model NVH displayed weak effects. These findings suggested a selective NVH efficacy.

In summary, we showed that NVH presents a model dependent hepatoprotective effect that may be mediated at least, through its radical scavenging property. Our findings are in line with *Neoboutonia velutina* traditional use and provide the first scientific arguments in favor of the traditional use of NV against hepatitis. Additional studies are needed to better understand NV mechanisms of action and then ensured its safe use. NVE mimics the traditional preparation. Even though that extract appeared toxic, it exhibited a therapeutic potential that could be interesting at very low doses.

Keywords: *Neoboutonia melleri* var *velutina*, hepatitis, treatment, antioxidant.

INTRODUCTION

Le foie est le plus volumineux des organes annexés au tube digestif. Du fait qu'il assure plusieurs fonctions vitales de l'organisme, toute atteinte à son bon fonctionnement menace la vie. Malheureusement, comme tout organe dans l'organisme, le foie reste une cible potentielle de diverses agressions exogènes ou endogènes. C'est ainsi qu'on désigne sous le terme d'hépatite, toute affection du foie atteignant l'ensemble du parenchyme et s'accompagnant d'une réaction inflammatoire. Cette réaction inflammatoire peut être aiguë ou chronique. Selon la cause de l'inflammation, on distingue les hépatites virales, causées par différents virus (VHA, VHB, VHC, VHD, VHE) [1] et les hépatites non virales, causées entre autres par, une consommation excessive d'alcool, une infestation par un parasite (le schistosome), une intoxication par un médicament ou une ingestion de poison.

Les hépatites virales constituent un problème de santé publique majeur dans le monde tant elles sont les causes majeures de morbidité grave et de décès avec 57% de cas de cirrhose du foie et 78% de cancer primitif du foie, résultant d'une hépatite B ou C. On estime à environ 130 à 150 millions le nombre de personnes porteuses chroniques du virus de l'hépatite C dans le monde et à environ 350 millions, le nombre de personnes présentant une atteinte chronique due au virus de l'hépatite B. Les plus fortes prévalences de l'hépatite B sont enregistrées en Afrique subsaharienne et en Asie orientale [2]–[4] tandis que la plus forte prévalence de l'hépatite C est enregistrée en Égypte où elle atteint 24% dans certaines zones rurales [5]. Par ailleurs, bien qu'une attention particulière soit accordée aux hépatites virales, on note que l'atteinte du foie due à une consommation excessive d'alcool (ALD), constitue la seconde cause de maladies graves du foie dans les pays développés [6]. Ainsi, malgré le faible nombre d'études cliniques enregistrées en ce qui la concerne [7], cette atteinte représente, elle aussi, une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde [8].

Ces dernières années, des progrès en recherche ont conduit à la mise en place des méthodes de prévention et de traitement efficaces contre les hépatites. Ces méthodes incluent les vaccins pour l'hépatite A et l'hépatite B, les immunomodulateurs, l'interféron alpha, les analogues de nucléosides, les antiviraux directs ou les corticoïdes [4], [6], [9], [10]. Contre l'hépatite C, d'autres traitements encore plus efficaces sont en cours de développement [11], [12]. Cependant, au regard de leurs coûts de plus en plus élevés, ces traitements bien qu'efficaces, ne sont pas encore totalement satisfaisants, car ne sont pas accessibles à tous les malades dans le monde [3]. Au-delà du coût, on note que les

traitements contre l'hépatite B ne permettent pas de guérir complètement de la maladie mais servent à ralentir la progression vers une cirrhose ou un cancer [4]. De plus, lorsqu'une prise en charge est possible, reste le problème des patients non répondants, celui des effets secondaires insupportables ou encore des interactions potentielles entre les différentes molécules composantes du traitement. Ainsi, considérant tous ces paramètres, nous pouvons dire que la question relative à la recherche de nouveaux traitements contre les hépatites reste ouverte [13]–[15].

Une approche thérapeutique alternative aux traitements actuels pourrait être les plantes médicinales, reconnues comme source de nouveaux médicaments et une alternative valable pour les soins de santé primaire [16]–[21]. Cependant, bien qu'utilisées depuis des siècles dans différents systèmes de santé traditionnels de par le monde et malgré l'expansion considérable de leur utilisation dans les pays développés, les données sur l'efficacité et la toxicité des plantes médicinales restent insuffisantes pour assurer leur utilisation en toute sécurité. Des études approfondies de leur efficacité, leur toxicité et leur mécanisme d'action pourraient être intéressantes, d'une part, pour la validation ou l'amélioration de leur utilisation traditionnelle et, d'autre part, pour le développement de nouvelles thérapies à moindre coût et avec moins d'effets secondaires [22]–[25]. Ceci permettrait une meilleure prise en charge des malades des pays en voie de développement et constituerait une alternative pour les pays développés.

Au Cameroun où les hépatites sont fréquentes (avec une prévalence supérieure à 10% pour l'hépatite C) [26], plusieurs plantes médicinales sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des affections du foie. L'Euphorbiacée *Neoboutonia velutina* fait partie de ces plantes. Elle est utilisée pour traiter les hépatites sans distinction de la cause. Cependant, comme beaucoup d'autres plantes, malgré son efficacité déclarée par le « médecin » traditionnel, *Neoboutonia velutina* n'a pas fait l'objet d'études pour vérifier cette efficacité, déterminer sa toxicité ou comprendre les mécanismes d'action qui pourraient sous-tendre cette action. Cette plante a retenu notre attention et a été au centre de cette étude dont l'objectif principal était la vérification et la caractérisation de son efficacité contre les hépatites non virales causées par des agents toxiques.

Pour atteindre cet objectif, nous avons entrepris :

- Une analyse phytochimique de l'extrait aqueux et de l'extrait éthanolique qui mime l'utilisation traditionnelle ;

-
- Une analyse cytotoxique (*in vitro*) et toxicologique aiguë (*in vivo*) de ces extraits (aqueux et éthanolique) afin de déterminer l'extrait le moins toxique ;
 - Une évaluation *in vitro* de l'effet anti-inflammatoire hépatique des différents extraits ;
 - Une évaluation *in vivo* de l'effet curatif des différents extraits contre l'hépatite causée par un agent toxique ;
 - Une évaluation *in vivo* de l'effet préventif de l'extrait le moins toxique et efficace ;
 - Un fractionnement de l'extrait choisi puis l'isolement des différents composés actifs présents dans les fractions ;
 - Une évaluation *in vivo* et/ou *in vitro* de la capacité antioxydante de l'extrait choisi, ainsi que de ses différentes fractions et composés.

Le travail présenté dans ce document s'articule en quatre chapitres : Un premier chapitre qui fait état de la littérature sur le sujet. Un second chapitre qui présente le matériel et la méthodologie utilisés pour atteindre nos objectifs. Un troisième chapitre qui présente l'essentiel des résultats obtenus à partir de notre méthodologie. Et un dernier chapitre qui apporte une explication aux résultats obtenus en s'appuyant sur les données de la littérature. A ces chapitres, font suite, nos conclusions et perspectives ainsi que la bibliographie référencée.

CHAPITRE I :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre reprend les grandes lignes sur les Euphorbiacées et l'espèce *Neoboutonia velutina*. Il rappelle le fonctionnement normal du foie et dresse un état des lieux des hépatites dans le contexte mondial. Il présente également les généralités sur les radicaux libres et les antioxydants, tout en montrant le lien qui existe entre ces radicaux libres et les hépatites.

I-1- LES EUPHORBIACEES ET NEOBOUTONIA VELUTINA

I-1-1- LA FAMILLE DES EUPHORBIACEES

I-1-1-1- Description

Les *Euphorbiacées* représentent une grande famille de plantes phanérogames et l'une des plus importantes, avec plus de 300 genres et environ 8000 espèces. De morphologies diverses, les plantes de cette famille élaborent souvent du latex et sont présentes partout dans le monde, sauf dans les régions antarctiques. Elles ont cependant un fort centre de dispersion dans le bassin de l'Amazone et dans d'autres régions tropicales.

Parmi les 300 genres des Euphorbiacées, on compte le genre *Neoboutonia*, peu connu. Les principaux genres étant le genre *Euphorbia*, (les Euphorbes) qui compte 2000 espèces cosmopolites, le genre *Croton*, avec 750 espèces, le genre *Phyllanthus*, avec 600 espèces et le genre *Acalypha*, avec plus de 400 espèces. Ces derniers genres sont retrouvés dans les régions tropicales et chaudes. On note également le genre *Glochidion*, avec 300 espèces, malgaches pour beaucoup d'entre elles ; le genre *Macaranga*, avec 280 espèces des régions tropicales de l'Ancien Monde, le genre *Jatropha*, avec 175 espèces des régions tropicales et chaudes d'Afrique et d'Amérique centrale, le genre *Antidesma* avec 170 espèces des régions tropicales et chaudes plutôt asiatiques, le genre *Tragia* et le genre *Manihot*, qui comptent 100 espèces chacun.

Parmi ces 300 genres d'Euphorbiacées, ceux qui sont retrouvés dans la flore française sont le genre *Euphorbia* avec environ 45 espèces indigènes plus une petite dizaine de naturalisées, le genre *Mercurialis*, avec 4 espèces, le genre *Chrozophora*, avec 1 espèce. A ces genres on peut ajouter 1 espèce adventice du genre *Andrachne*, ainsi que l'espèce *Ricinus communis* L. (le Ricin), cultivé et parfois naturalisé. [27] ; [28]

I-1-1-2- Caractéristiques botaniques

Les Euphorbiacées, au regard de leur appareil végétatif, présentent une diversité extraordinaire. Elles peuvent ainsi être des arbres, des arbustes, des buissons, des herbes vivaces, des herbes annuelles, des lianes ou des plantes succulentes et cactiformes. Leurs feuilles sont souvent stipulées et parfois munies de 2 glandes nectarifères à la base du limbe ou sur le pétiole. Ces feuilles souvent simples, entières, alternes ou palmées (à l'exemple du Ricin), sont quelques fois composées, parfois opposées (à l'exemple des Mercuriales) ou réduites à des épines.

Il est fréquemment noté chez les euphorbiacées, la présence des laticifères producteurs de latex blanc ou coloré. Ceux-ci peuvent être articulés comme chez l'Hévéa en présentant des cloisons à perforations, ou vrais comme chez les Euphorbes, avec la présence de grains d'amidon « en tibia », renflés aux extrémités. Pour ce dernier cas, on note parfois la présence de phloème interne.

De même que l'appareil végétatif, l'appareil reproducteur des Euphorbiacées présente une très grande diversité. Il existe cependant quelques paramètres constants. A l'exemple des fleurs toujours unisexuées, des ovules munis d'un obturateur d'origine placentaire, du gynécée formé par 3 (rarement 2) carpelles soudés, du fruit qui est une capsule, presque toujours tricoque, à déhiscence triple, ou de la graine présentant généralement une caroncule [28].

I-1-1-3- Classification interne

Les Euphorbiacées sont subdivisées en cinq sous-familles, en fonction du nombre d'ovules par loge et du type de laticifères. On distingue ainsi :

- Deux sous-familles d'Euphorbiacées avec 2 ovules par loge et pas de lactifères :
 - La sous-famille des *phyllanthoideae* présentant des feuilles alternes, simples, stipulées, des fleurs munies de pétales et des graines sans caroncule (*Phyllanthus*, *Securinega*, *Bischofia*, *Antidesma*, *Drypetes...*),
 - La sous-famille des *Oldfieldioideae* avec des feuilles parfois opposées ou verticillées, simples ou palmées, des stipules petites ou absentes, des fleurs apétales et des graines souvent munies d'une caroncule. (*Oldfieldia*, *Androstachys...*).
- Trois sous-familles d'Euphorbiacées avec 1 ovule par loge :

-
- La sous-famille des *Acalyphoideae* n'ayant pas de laticifères (*Acalypha*, *Ricinus*, *Mercurialis*, *Macaranga*, *Dalechampia*, *Chrozophora*...),
 - La sous-famille des *Crotonoideae* ayant des laticifères souvent articulés, un latex souvent inoffensif, rouge ou blanc jaunâtre, des feuilles souvent à nervation palmée, et une inflorescence non disposée en cyathium (*Croton*, *Hevea*, *Manihot*, *Jatropha*, *Aleurites*...)
 - La sous-famille des *Euphorbioideae* ayant des laticifères vrais donnant un latex blanc toujours toxique, des feuilles à nervation pennée, et une inflorescence en cyathium (*Euphorbia*, *Pedilanthus*, *Anthostema*, *Hippomane*, *Hura*.....).[28]

I-1-1-4- Utilisation courante

Parmi les Euphorbiacées, certaines sont alimentaires, comme la cassave qui est une féculé préparée à partir du manioc (*Manihot esculenta* Crantz) et qui constitue dans les zones tropicales du globe, l'aliment amylicé de base d'environ 500 millions d'habitants. D'autres ont un rôle industriel majeur comme l'Hévéa (*Hevea brasiliensis* (A. Juss) Muell. Arg.), producteur de caoutchouc ou le Ricin (*Ricinus communis* L.) dont les graines fournissent une huile, matière première pour la synthèse de polymères et de surfactants. D'autres Euphorbiacées enfin, comme la cire de candelilla (*Euphorbia antispyllitica* Zucc.) ou les huiles de *Aleurites*, sans avoir une importance de premier plan, ne sont pas dénuées d'intérêt.

Les Euphorbiacées sont également utilisées pour l'ornement. On retrouve ainsi des intérieurs ornés de crotons (*Codiaeum*), de poinsettias (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch également appelé *Poinsettia pulcherrima* J. Graham), de *Acalypha* ou d'euphorbes cactiformes [27].

I-1-1-5- Propriétés ethnobotaniques

Les Euphorbiacées sont assez souvent utilisées dans les systèmes traditionnels de médecine pour traiter diverses pathologies. Leur utilisation varie d'une région à une autre en fonction de la partie de la plante utilisée, du mode d'emploi et de la pathologie à traiter. C'est donc qu'elles peuvent être utilisées comme anti-inflammatoires, anti-pyrétiques (*Euphorbia acaulis* Roxb.), antibactériens (*Ricinus communis* Linn.), analgésiques (*Xanthium strumarium* Linn) ou cicatrisants (*Euphorbia nerifolia* Linn) [29]. Certaines Euphorbiacées comme *Euphorbia apios* L

sont utilisées comme laxatif [30]. D'autres comme *Acalypha hederacea* Torr. sont utilisées comme anti-diarrhéique [31] ; ou encore *Euphorbia abyssinica* J. F. Gmel., et *Jatropha curcas* Linn. utilisées comme anti-fongiques [32][29]. L'espèce *Ricinus communis* Linn. citée précédemment, est également utilisée contre l'indigestion [31], le mal d'estomac et les brûlures [32]. Les Euphorbiacées sont également retrouvées dans le traitement des affections comme la gonorrhée (*Euphorbia cuneata* Vahl ; *Croton dichogamus* pax), les troubles respiratoires (*Croton megalocarpus* Hutch.), l'arthrite (*Croton dichogamus* pax.), ou l'infertilité (*Euphorbia candelabrum* Kotschy) [33].

I-1-1-6- Etudes ethnopharmacologiques

Au-delà des études ethnobotaniques visant à recenser les plantes et leur utilisation traditionnelle, les propriétés pharmacologiques de plusieurs Euphorbiacées ont été vérifiées. Il a ainsi été confirmée, les propriétés anti-paludiques de *Croton zambesicus*, *Neoboutonia glabrescens* [34] et *Euphorbia hirta* [35], les propriétés anti-nociceptives et anti-inflammatoires de *Croton malambo* [36] et *Bridelia scleroneura* [37], les propriétés anti-tumorales de *Croton lechleri* Mull. Arg. [38] et de *Synadenium grantii* [39], les propriétés pro-coagulantes de *Euphorbia nivulia*, *Pedilanthus tithymaloides* et *Synadenium grantii* [40], les propriétés cicatrisantes de *Euphorbia caducifolia* [41] et de *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit [42], les propriétés anti-herpes de type 2 de *Phyllanthus orbicularis* [43], les propriétés anti-microbiennes de *Euphorbia hirta* [44], les propriétés anti-bactériennes de *Alchornea floribunda* [45].

I-1-1-7- Produits du métabolisme et principaux composés isolés des Euphorbiacées

Chez les végétaux en général, on distingue deux types de métabolites : les métabolites primaires, issus du métabolisme primaire et participant directement à la croissance, au développement et à la reproduction de la plante ; les métabolites secondaires, issus du métabolisme secondaire et qui, bien que ne participant pas directement aux processus physiologiques fondamentaux de la plante, peuvent intervenir dans sa reproduction (par attraction des pollinisateurs) ou dans sa protection contre les agressions externes (pathogènes, herbivores...) [46][47]. Les métabolites primaires peuvent ainsi être : les protéines, les lipides, les glucides ou les acides nucléiques. Tandis que les métabolites secondaires sont classés en trois

types : les composés phénoliques (flavonoïdes, saponines, tanins, lectines...), les composés azotés (alcaloïdes, hétérosides cyanogènes, bétalaïnes, glucosinolates...) et les terpénoïdes (monoterpènes, diterpènes, triterpènes, sesquiterpènes, sesterterpènes, polyterpènes...) [47].

Chez les Euphorbiacées, on retrouve comme métabolites primaires : les glucides (dans les tubercules du manioc, *Manihot esculenta* Crantz), les lipides (dans les graines du Ricin, *Ricinus communis* L) [28], les protéines (la curcine et l'inhibiteur de trypsine de *Jatropha curcas* L) [47]. Comme métabolites secondaires on retrouve : les lectines [28], les alcaloïdes (l'antidesmone isolé de *Antidesma membranaceum* et de *Antidesma venosum*) [48] ; [49], les saponines (retrouvés de *Jatropha curcas* L) [47], les phénols et flavonoïdes (à l'exemple de la scopolitine, la scoparone, l'isoscopoletine, la quercétine, l'isorhamnétine, la pinocembrine, le kaempferol, la lutéoline, et l'acide gallique, tous isolés de *Euphorbia hirta*) [50], les terpénoïdes parmi lesquels, les sesquiterpènes lactones et friedelanes (à l'exemple de la drypemolundein A et la drypemolundein B isolées de *Drypetes molunduana* Pax and Hoffm) [51], les sesterterpènes et squalènes (isolés de *Croton hieronymi*), [52], et les diterpénoïdes qui sont les terpénoïdes les plus fréquemment rencontrés chez les Euphorbiacées. On peut ainsi citer comme diterpénoïdes : les esters de phorbols (dérivés du tiglane), isolés de *Jatropha curcas* L, *croton spareiflorus*, *Euphorbia frankiana*... [53] ; [47] ; la prostratine, un ester de phorbol non promoteur de tumeur et à activité antivirale (anti HIV-1), isolé de *Homalanthus nutans* [54] ; [55] ; [56] ; les labdanes, isolés des écorces de *Croton oblongifolius* et le Crotonadiol, un autre labdane isolé des écorces de *Croton zambesicus* [57] ; [58].

I-1-1-8- Toxicité des Euphorbiacées

Un grand nombre d'espèces de la famille des Euphorbiacées présente une toxicité qui a été attribuée aux esters diterpéniques de structure très complexe (tiglianes, daphnanes, ingénanes). D'autres espèces doivent par contre leur toxicité aux lectines (ricin) ou aux hétérosides générateurs d'acide cyanhydrique (manioc mal préparé) [27]. Cependant, il a été reconnu chez les Euphorbiacées, trois groupes d'esters diterpéniques : Un premier groupe regroupant les esters de phorbols et ingénoïl, considérés comme étant exclusivement des toxines sans possibilité d'effet médicinal. Un second groupe constitué de composés présentant une toxicité mais qui aux doses adéquates présentent une perspective thérapeutique à l'exemple de la résinifera toxine à effet capsaïcine-like. Un troisième groupe regroupant les diterpènes non phorboïde avec des structures macrocyclique

et polycyclique. Ces diterpènes n'ont pas d'effet toxique ou ont un effet toxique très réduit mais présentent une activité biologique intéressante à l'exemple de l'activité antiMDR (Multidrug Resistance) lors d'un cancer du côlon, l'activité antiproliférative, l'effet sur la tubuline...[59] ; [60] ; [61].

I-1-2- LE GENRE *NEOBOUTONIA*

I-1-2-1- Description

Le genre *Neoboutonia* de la famille des Euphorbiacées, est retrouvé en Afrique tropicale continentale où il est largement distribué en Afrique tropicale de l'Ouest. Il ne compte que 3 espèces parmi lesquels, *Neoboutonia macrocalyx* et *Neoboutonia mannii* Benth, encore appelé, *Neoboutonia diaguissensis* Beille ou *Neoboutonia glabrescens* Prain. La troisième espèce de ce genre est *Neoboutonia melleri* (Müll.Arg) Prain [62]; [63] ; [64] dont l'un des synonymes ou la variété est *Neoboutonia velutina* Prain.

Neoboutonia macrocalyx est réparti depuis l'est de la République Démocratique du Congo jusqu'au Kenya, et vers le sud jusqu'au Zimbabwe et au Mozambique (Figure 1A). [62].

La distinction entre *Neoboutonia mannii* Benth et *Neoboutonia melleri* (Müll.Arg) Prain (synonyme *Neoboutonia velutina* Prain) est douteuse car les deux espèces présentent des différences minimales. Elles sont toutes les deux en général, de petits arbres à plusieurs troncs, atteignant 12(-20) m de haut [62]. *Neoboutonia glabrescens* Prain (synonyme *Neoboutonia mannii* Benth) est cependant décrit par d'autres auteurs comme étant un arbre à bois doux, d'environ 1,7 m de haut, retrouvé dans les espaces ouverts des forêts [65] ; [66]. Comparé à *Neoboutonia macrocalyx*, *Neoboutonia mannii* Benth et/ou *Neoboutonia melleri* (Müll.Arg) Prain (synonyme *Neoboutonia velutina* Prain) ont une répartition plus large. Ces deux espèces présentent une aire de répartition combinée et s'étendent de la Guinée jusqu'au sud du Soudan et en Ouganda, vers le sud jusqu'en Zambie, en Angola et au Mozambique (Figure 1B et C).

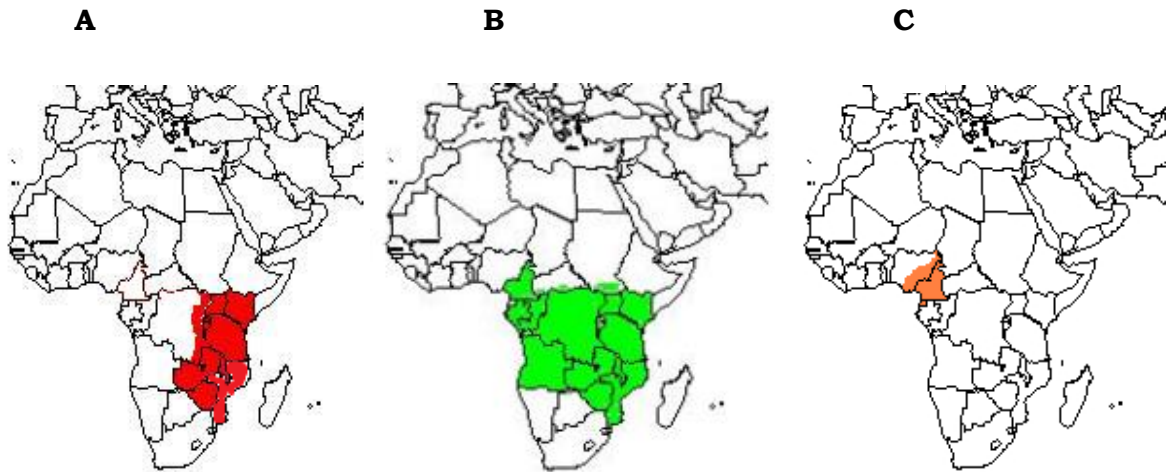


Figure 1 : Distribution des espèces du genre *Neoboutonia* [62], [63], [65]

A : *Neoboutonia macrocalyx* Pax, B : *Neoboutonia melleri* (syn *Neoboutonia velutina*), C : *Neoboutonia mannii*.

I-1-2-2- Utilisation courante

Les espèces du genre *Neoboutonia* sont couramment utilisées à des fins diverses en fonction des localités. Ainsi, en Afrique de l'Est, le bois de *Neoboutonia macrocalyx* est utilisé pour la construction des habitations, la sculpture et les parties internes du contreplaqué. Tandis qu'en Tanzanie, il est utilisé pour la construction des caisses, des cageots, des tabourets, des pots à eau et des ruches. En général, le bois de *Neoboutonia macrocalyx* sert comme bois de feu et conviendrait pour la production de pâte à papier. En Ouganda, par souci de conservation des sols, *Neoboutonia macrocalyx* a été planté.

De même que *Neoboutonia macrocalyx*, le bois de *Neoboutonia mannii* Benth et/ou *Neoboutonia melleri* (Müll.Arg) Prain (synonyme *Neoboutonia velutina* Prain) est utilisé pour les constructions et comme bois de feu en République Démocratique du Congo. En Tanzanie, ces deux espèces sont utilisées pour un usage similaire à celui de *Neoboutonia macrocalyx* décrit plus haut. En plus, en Afrique de l'Ouest, le bois de *Neoboutonia mannii* et/ou *Neoboutonia melleri* est scié pour en faire des planches [62].

I-1-2-3- Propriétés ethnobotaniques

En dehors de leur utilisation courante, les trois espèces du genre *Neoboutonia* sont affectées à un usage médicinal. C'est ainsi qu'en Afrique de l'Est, l'infusion et les râpures des racines de *Neoboutonia macrocalyx* sont utilisées comme purgatif, la

décoction des racines comme antidiabétique, l'infusion des feuilles comme émétique (vomitif). La décoction des feuilles est cependant utilisée contre les vertiges tandis que la décoction des feuilles et d'écorce de ramilles se boit et s'applique en lotion contre la fièvre.

Par ailleurs, la décoction de racine et d'écorce de *Neoboutonia mannii* et/ou *Neoboutonia melleri* est utilisée au Congo et en République Démocratique du Congo (RDC) comme purgatif et vermifuge. Cette décoction est cependant contre-indiquée chez les femmes enceintes compte-tenu de ses propriétés abortives. En outre, à l'est de la RDC, les racines de ces deux espèces sont mâchées pour le traitement de la gonorrhée. Au Cameroun, comparé au Congo et la RDC, on retrouve des similitudes à l'usage médicinal de *Neoboutonia mannii* (synonyme *Neoboutonia glabrescens*) et/ou *Neoboutonia melleri*. C'est ainsi qu'on retrouve l'écorce de ces plantes, utilisée comme vermifuge et antipaludique. Cette écorce aux propriétés irritantes pour la peau est également utilisée contre les douleurs abdominales et les maux d'estomac [67]. Par ailleurs, la poudre de l'écorce cuite de l'une ou l'autre de ces espèces, est consommée en prise unique hebdomadaire en prévention des crises d'épilepsie ; en revanche, ce traitement entraîne des diarrhées et des vomissements et peut être mortel à des doses élevées [62].

I-1-2-4- Etudes ethnopharmacologiques et composés isolés du genre *Neoboutonia*

Si de nombreuses études pharmacologiques sont menées sur les Euphorbiacées en général, celles sur le genre *Neoboutonia* sont plutôt rares. Cependant, il a été montré une légère activité anti-plasmodiale de *Neoboutonia macrocalyx*, en même temps qu'une forte toxicité chez les crevettes [68]. Cette toxicité de *Neoboutonia macrocalyx* serait attribuée aux diterpénoïdes de type tigliane [69] et daphnane isolés de cette espèce et connus comme étant toxiques [70]. De même, il a été isolé de *Neoboutonia glabrescens* (synonyme *Neoboutonia mannii*) un nouveau diterpénoïde de type daphnane (glabrescin), un dérivé tigliane connu, un daphnane connu (montanin) et d'autres composés comme le squalène, l'acide 3-acetylaleuritolique, l'acide oléanolique, le sitostérol et les composés phénoliques (la 9-methoxy-1,7-dimethylphenanthrene et l'acide 2, 3, 8- tri-O-methylellagique) [66]. De plus, 2 diterpénoïdes dégradés (neoboutomannin et manniorthoquinone), ainsi que l'acide 3-acetylaleuritolique connu, le 3,6-dihydroxy-9-methoxy-1,7-dimethylphenanthrene et le sitosterol 3- O- β - D -glucopyranoside ont été isolés des écorces de *Neoboutonia mannii* (synonyme *Neoboutonia glabrescens*). L'activité

antibactérienne et antifongique de ces composés, à l'exception de la manniorthoquinone, a été évaluée. Il a ainsi été noté une activité antibactérienne et antifongique de la neoboutomannin, de l'acide 3-acetylaleuritolique et de la 3,6-dihydroxy-9-methoxy-1,7- diméthylphenanthrene tandis que la sitosterol 3- O- β - D -glucopyranoside était inactive contre les agents microbiens testés [71]. On remarquera en plus, qu'une activité anti-plasmodiale de *N. glabrescens* a été décrite en 2009 par Boyom et al. [34].

I-1-3- L'ESPECE *NEOBOUTONIA VELUTINA*

Une documentation propre à l'espèce *Neoboutonia velutina* Prain est quasiment inexistante. Néanmoins, il ressort des documents disponibles, une description de cette espèce en tant que synonyme ou variété de l'espèce *Neoboutonia melleri*. Ainsi, en fonction des documents, l'espèce *Neoboutonia velutina* Prain apparait soit comme une variété de *Neoboutonia melleri*, en prenant le nom de *Neoboutonia melleri* var *velutina* (Prain) Pax & K. Hoffm, soit comme assimilée de l'espèce *Neoboutonia melleri* en lui étant synonyme. *Neoboutonia velutina* serait donc une variété de *Neoboutonia melleri*, retrouvée au Cameroun [62], [63], [65].

I-1-3-1- Classification

Règne	: Végétal
Embranchement	: Spermaphyte (plante à graine)
Sous-embranchement	: Angiosperme (<i>Magnoliophyta</i> : Plantes à fleurs)
Classe	: Dicotylédones (<i>Magnoliopsidae</i>)
Sous classe	: <i>Rosidae</i>
Ordre	: <i>Malphigiales</i>
Famille	: <i>Euphorbiaceae</i>
Genre	: <i>Neoboutonia</i>
Espèce	: <i>Neoboutonia velutina</i> Prain.

I-1-3-2- Description et propriétés ethnobotaniques

Neoboutonia velutina Prain est un arbuste de 12 (-20) mètres de haut (15-20 ft). Avec son écorce blanchâtre et ses fleurs jaunes, il est retrouvé dans les zones humides des régions forestières. Au Cameroun, on retrouve cette espèce principalement à l'Est et l'Ouest [65] [72] et accessoirement au Centre (Figure 2).

Sous le nom de *Neoboutonia velutina* Prain, il a été rapporté une propriété antipaludique de cette espèce [73]. Mais, en considérant que *Neoboutonia velutina* est assimilé à *Neoboutonia melleri*, les propriétés ethnobotaniques reconnues précédemment à *Neoboutonia melleri* le sont également pour *Neoboutonia velutina*. Par ailleurs, lors de nos différentes récoltes de *Neoboutonia velutina* et suite à notre entretien avec le « médecin » traditionnel, il ressort une utilisation traditionnelle de cette espèce pour traiter les hépatites et lutter contre la constipation.



Figure 2 : Photos de *Neoboutonia melleri var velutina* Prain (par nos soins)

A : Arbuste dans son environnement naturel ; B : Ecorce

I-1-3-3- Etudes ethnopharmacologiques et composés isolés de *N. velutina*

A nos jours, aucune étude pharmacologique n'a été menée sur l'espèce *Neoboutonia velutina* Prain proprement dite. Néanmoins, en assimilant *Neoboutonia velutina* à *Neoboutonia melleri*, on note qu'il a été isolé des feuilles de *N. melleri*, deux nouveaux diterpènes (les mellerines A et B), en plus de trois stéroïdes connus [74]. De même, il a été isolé des feuilles de *N. melleri*, une trentaine de nouveaux composés, dérivés du cycloartane. Ces composés ont ensuite démontré une intéressante activité inhibitrice du protéasome, suggérant ainsi leur possible utilisation comme anticancéreux [64]. Par ailleurs, l'intéressante activité de ces composés et l'identification de la liaison chimique responsable de celle-ci, ont inspiré l'hémi-synthèse de dérivés (les dérivés du neoboutomellerone 1 et 2) parmi lesquels, certains qui ont démontré une activité inhibitrice du protéasome [75].

I-2- LE FOIE ET LES HEPATITES

I-2-1 LE FOIE

I-2-1-1 Anatomie

Le foie et la vésicule biliaire sont des organes annexes associés à l'intestin grêle. Rougeâtre et rempli de sang, le foie est la plus grosse glande de l'organisme. Chez l'adulte moyen, sa masse est de l'ordre de 1,4 kg, dont 800 à 900 g de sang [76]. En forme de coin et entouré d'une fine capsule appelée capsule de Glisson, le foie est situé dans le cadran supérieur droit, sous la coupole diaphragmatique. Il occupe la plus grande partie des régions hypochondriaque droite et épigastrique et s'étend plus à droite qu'à gauche de la ligne médiane du corps. On le divise généralement en quatre lobes : deux lobes principaux séparés en surface par le ligament falciforme ; le lobe droit, plus volumineux et visible sur toutes les faces du foie et le lobe gauche, plus petit. A ces deux lobes principaux, sont annexés le lobe caudé, le plus postérieur et le lobe carré situé sous le lobe gauche. Alors que les lobes caudé et carré sont visibles en vue de dessous du foie, la vésicule biliaire elle, est accolée à la face inférieure du lobe droit [77] ; [78].

I-2-1-2- Histologie

I-2-1-2-1- Populations cellulaires du foie [79]–[84] ; [84]–[88]

Plusieurs populations cellulaires sont retrouvées dans le foie. On y distingue : les cellules parenchymateuses (hépatocytes et cholangiocytes encore appelés cellules épithéliales biliaires) et les cellules non parenchymateuses (cellules endothéliales sinusoidales, cellules de kupffer, cellules étoilées...). Les hépatocytes tout comme les cholangiocytes sont dérivés de l'endoderme embryonique alors que les cellules du stroma ou cellules non parenchymateuses (cellules de kupffer, cellules étoilées ...) trouvent leur origine dans le mésoderme embryonique. Contrairement aux hépatocytes qu'on retrouve dans le parenchyme hépatique et qui occupent presque 80% du volume total du foie, les cellules non parenchymateuses sont localisées au niveau du compartiment sinusoidal et occupent seulement 6,5% du volume total du foie mais constituent tout de même 40% environ du nombre total des cellules du foie.

Ainsi, les hépatocytes sont les principales cellules du foie et forment l'essentiel de l'organe puisque qu'elles comptent pour environ 70% de la masse totale d'un foie

adulte et 60 à 70% du nombre total des cellules du foie. Grandes, de forme polygonale et polarisées, les hépatocytes assurent la majorité des fonctions du foie et sont disposés en travées monocellulaires rayonnant des espaces portes vers les veinules hépatiques terminales adjacentes. On appelle plaque limitante l'interface entre les tissus conjonctifs de la voie porte et le parenchyme hépatique. Elle est formée par les hépatocytes entourant la voie porte.

Les cholangiocytes ou cellules épithéliales biliaires représentent 3% de la population cellulaire du foie et tapissent l'épithélium des canaux biliaires. Elles contrôlent le débit et le pH de la bile, secrètent de l'eau et du bicarbonate [79]–[84].

Dans un foie adulte, il a été identifié des cellules dites « cellules progénitrices » qui sont des cellules souches bipotentes capables de se différencier en hépatocytes et cholangiocytes. Retrouvées chez les humains et les animaux, ces cellules progénitrices encore appelées cellules hépatobiliaires intermédiaires ou cellules ovales chez la souris, ont l'apparence d'un petit hépatocyte avec un noyau ovale et un cytoplasme réduit. En microscopie, sous une coloration Hématoxyline/Eosine classique, elles sont difficilement reconnaissables par leur forme mais plusieurs marqueurs immunohistologiques permettent de les identifier. Certains de ces marqueurs sont, l'OV6 pour le rat, la chromogranine A (chrom-A) et les cytokératines (CK-7, CK-8, CK-18 et CK-19). CK-7 et CK-19 représentant les plus fiables et les plus acceptés. En outre, les cellules progénitrices ont été identifiées et étudiées comme potentielle cible thérapeutique pour la régénération hépatique. Elles sont retrouvées dans le canal de Héring qui représente la plus petite et la plus périphérique des branches de l'arbre biliaire reliant le système canaliculaire de la bile aux canaux biliaires inter lobulaires [84]–[88].

Les cellules endothéliales sinusoidales représentent quant à elles, environ 2,5% du parenchyme lobulaire et sont localisées dans les sinusoides. Hautement spécialisées, ces cellules endothéliales diffèrent des autres cellules endothéliales vasculaires de l'organisme ; par l'absence de membrane basale et par les nombreuses fenêtres qui permettent le transfert des molécules et des protéines entre le sérum et les hépatocytes. Elles forment le plexus sinusoidal pour faciliter la circulation, captent les déchets des macromolécules, secrètent les cytokines et interviennent dans la coagulation du sang.

Les cellules de Küpffer sont des macrophages spécifiques du foie. Retrouvées dans les sinusoides, elles représentent environ 2% du foie total et 80% de la

population totale des macrophages de l'organisme. De par leur capacité à phagocyter, les cellules de kuppfer participent à la défense de l'organisme en éliminant les endotoxines et autres substances nocives du sang. Elles sont également capables de sécréter les médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire (cytokines, endothélines, prostanoïdes et l'oxyde nitrique...). Ces cellules n'ont cependant pas qu'un rôle de défense, elles peuvent également contribuer à la destruction du foie.

Les cellules étoilées anciennement appelées cellules Ito, cellules de stockage des lipides, cellules périsinusoïdales ou lipocytes, représentent environ 1,4% de la population cellulaire du foie et ont une localisation perisinusoïdale. Elles contribuent à la maintenance de la matrice extracellulaire, stockent la vitamine A, contrôlent le tonus microvasculaire et secrètent les cytokines. Activées par certaines cytokines lors des lésions hépatiques, ces cellules étoilées perdent leurs gouttelettes de lipides et se transforment en myofibroblastes prolifératifs, fibrogènes et contractiles. Elles interviennent ainsi dans la fibrogénèse hépatique et constitueraient une cible potentielle pour les traitements antifibrotiques.

A ces cellules, s'ajoutent les lymphocytes intrahépatiques souvent présents dans la lumière sinusoïdale et incluant les cellules de Pit qui sont les cellules NK (« natural killer ») spécifiques du foie. Ces cellules de Pit sont assez rares et ont une activité cytotoxique pour les cellules tumorales et les cellules infectées par un virus [79]–[84].

I-2-1-2-2- Lobule et acinus hépatiques

Sur le plan microscopique, l'unité architecturale du foie est le lobule hépatique. C'est une structure cylindrique de plusieurs millimètres de long et 0,2 à 0,8 millimètre de diamètre. Il est limité par quatre à six espaces portes alimentés par la veine porte et l'artère hépatique. En son centre, il possède une veinule hépatique terminale appelée veine centrolobulaire d'où partent les cordons d'hépatocytes séparés par les sinusoïdes. Une extension de l'espace porte ou espace interlobulaire séparant deux lobules est appelé fissure de Kiernan. Chaque espace porte montre : des sections du canal biliaire, des branches de l'artère hépatique et de la veine porte hépatique (Figure 4). Les vaisseaux lymphatiques y sont également présents mais très difficiles à voir sous une faible puissance [89]; [80] ; [83].

On compte chez l'homme, 50 000 à 100 000 lobules hépatiques environ [89] ; [80] mais ces lobules sont difficilement visibles par les techniques histologiques

habituelles. Cependant, dans certaines espèces animales comme le porc, où les limites entre deux lobules adjacents sont bien marquées par du tissu conjonctif, ceux-ci sont plus facilement visualisés [82].

Sur le plan physiologique, plutôt que le lobule hépatique on considère l'acinus hépatique comme l'unité la plus logique. Il est l'unité fonctionnelle et microvasculaire du foie et représente une grappe de cellules parenchymateuses regroupées autour des branches terminales de l'artériole hépatique et de la veine porte. Le centre de l'acinus est occupé par l'espace porte tandis que les veinules hépatiques terminales se trouvent à la périphérie. Il se divise en trois zones déterminées par la proximité des vaisseaux qui les alimentent. Les zones 1 et 2 sont situées au niveau de l'espace porte alors que la zone 3 est localisée en périphérie, à la limite externe de l'acinus (Figure 3). On compte approximativement, 100 000 acini dans un foie humain, chacun d'un diamètre de 2mm environ [80] ; [82].

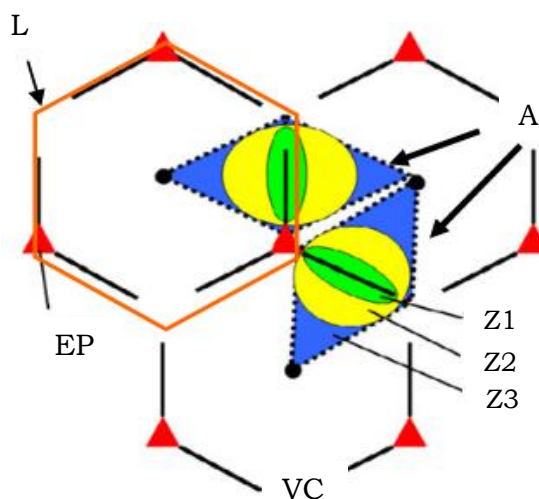


Figure 3 : Positionnement schématisé des acini et lobules hépatiques [90].

Le losange représente le lobule hépatique (L), le point au milieu du losange représente la veine centrolobulaire (VC), les côtés du losange représentent les espaces portes (EP). Les pointillés délimitent l'acinus hépatique (A) avec ses différentes zones : La zone 1 en vert, la zone 2 en jaune et la zone 3 en bleu.

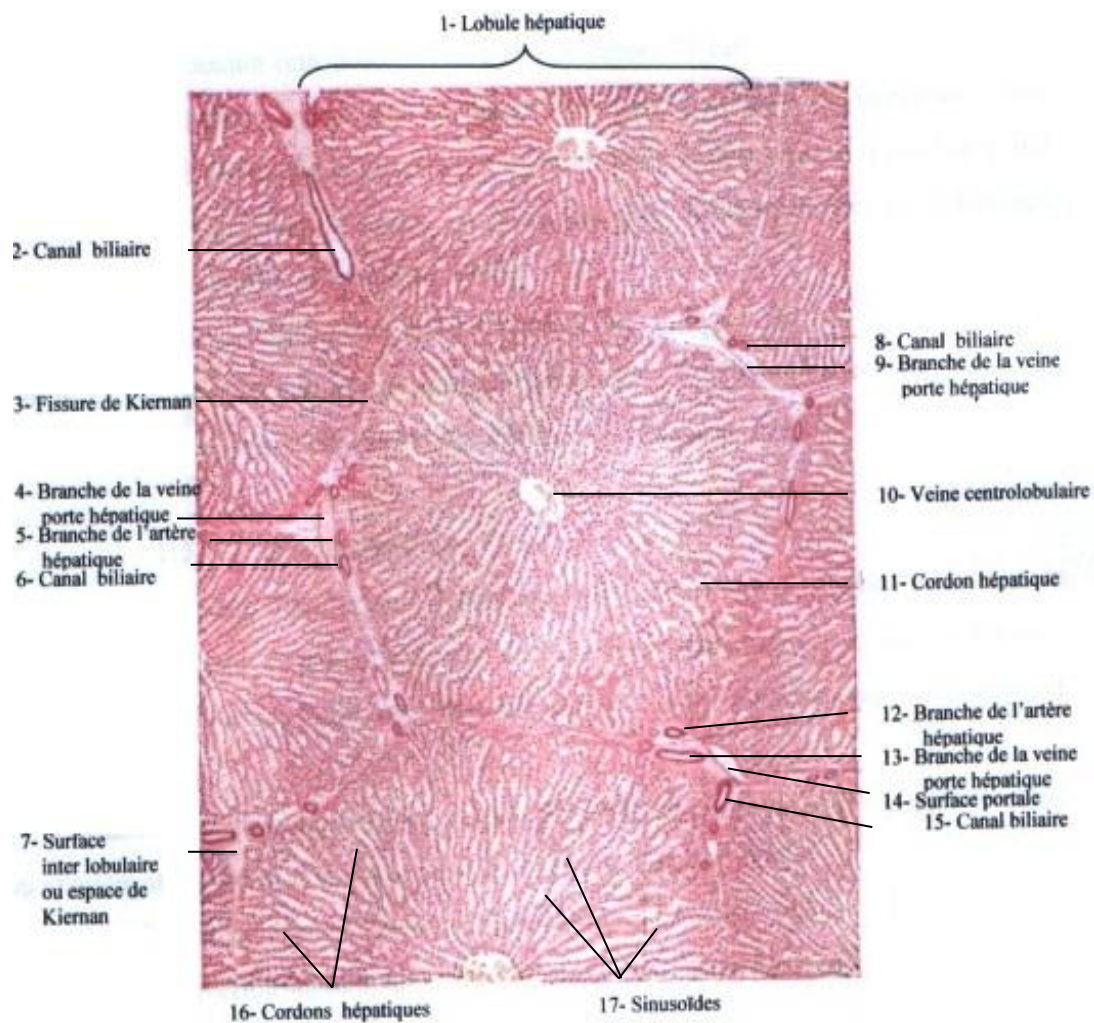


Figure 4: **Coupe schématique d'un lobule hépatique** [91].

I-2-1-3- Irrigation du foie

Le foie reçoit un double apport sanguin : par la veine porte qui transporte le sang en provenance de l'appareil digestif et par l'artère hépatique qui fournit au foie un sang riche en oxygène, en provenance du cœur. Son drainage se fait par les veines sus-hépatiques droite, gauche et moyenne qui se déversent à la partie postérieure du foie dans la veine cave inférieure [77] ; [80]. Bien qu'il ne constitue qu'environ 2,5% du poids du corps, le foie reçoit 25% du débit sanguin cardiaque. Les cellules du parenchyme hépatique sont ainsi les cellules les plus richement perfusées de toutes les cellules des organes et sont en contact avec le perfusât sur au moins deux faces. Environ 25% du débit sanguin hépatique (100-130mL/min/100g de foie soit 30mL/min/kg de poids corporel) proviennent de l'artère hépatique tandis que les 75% restant proviennent de la veine porte.

Précédemment abordé, l'acinus représente l'unité microvasculaire du foie et tous ces apports sanguins se font par la zone périportale de l'acinus (zone 1 et 2) et toutes les sorties par la périphérie (zone 3). De ce fait, on retrouve dans la zone centrale de l'acinus, une très forte oxygénation et une forte activité des enzymes respiratoires, tandis que la zone périphérique reçoit le sang pauvre en oxygène et compte plusieurs enzymes microsomales. Dans la zone 1, des rameaux de chaque veinule porte et artériole hépatique pénètrent dans l'acinus au niveau de l'espace porte pour alimenter le foie. Le sang issu des zones 1 et 2 passe ensuite dans les capillaires sinusoïdes entre les travées d'hépatocytes et vers la veinule hépatique terminale (zone 3) où se déversent plusieurs acini adjacents [82].

I-2-1-4- Régénération hépatique

Le foie est unique dans son extraordinaire capacité à se régénérer après une lésion. Il a ainsi une habileté à retrouver sa masse initiale même après une destruction massive des cellules parenchymateuses ou une opération chirurgicale entraînant le retrait d'une portion significative de celui-ci. Cette extraordinaire capacité qui a rendu possible la transplantation du tissu hépatique à partir d'un donneur vivant, est due à la capacité des hépatocytes et cholangiocytes à proliférer presque indéfiniment pour se renouveler en situation normale (turn-over) ou pour répondre à une lésion ou une hépatectomie.

En effet, dans les conditions normales, les hépatocytes et les cholangiocytes sont quiescents avec un faible turn-over. Cependant, suite à une lésion ou une perte de masse hépatique, les hépatocytes et cholangiocytes entrent en prolifération pour restaurer les conditions normales. Cette réponse des hépatocytes et cholangiocytes constitue la première ligne de défense du foie en réponse à une lésion. On observe dans ce cas une prolifération active des hépatocytes et cholangiocytes. Par ailleurs, en situation de pathologie chronique du foie, la prolifération des hépatocytes et des cholangiocytes est inhibée et les cellules progénitrices restées quiescentes jusque-là, s'activent pour se différencier en hépatocytes ou cholangiocytes, favorisant ainsi le retour aux conditions normales. Cette réponse des cellules progénitrices suite à l'inhibition de la prolifération des hépatocytes constitue la deuxième ligne de défense du foie pour se régénérer [84], [86]-[88]. Cependant, plutôt qu'une vraie régénération, ce processus est une réponse compensatoire hyperplasique avec perte de la structure anatomique initiale [92], [93].

I-2-1-5- Fonctions du foie

Le foie assure plusieurs fonctions vitales et complexes de l'organisme. Regroupées en fonctions endocrine et exocrine, la principale fonction exocrine du foie est la production de la bile et sa fonction endocrine inclue la sécrétion des hormones comme l'insulin-like growth factor (IGF), l'angiotensinogène ou la thrombopoétine.

Ainsi, le foie joue un rôle très important dans le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides. C'est donc, qu'il permet le stockage du glycogène et intervient dans la détoxification des médicaments et des substances toxiques absorbés par voie orale ; qu'il contrôle le métabolisme de l'urée, régule la synthèse et le transport du cholestérol, de même que la sécrétion de plusieurs protéines plasmatiques comme l'albumine et l'apolipoprotéine. En conjonction avec la rate, le foie assure également la destruction des globules rouges usagés et la récupération de leurs constituants. Outre ces fonctions métaboliques, on lui connaît un rôle important dans la protection de l'organisme [94] ; [80] ; [83] ; [95].

Les rôles spécifiques du foie dans les différents processus métaboliques sont :

- **Métabolisme des glucides** : le stockage du glycogène (glycogénogenèse), la conversion du galactose et fructose en glucose, la néoglucogenèse et la formation de nombreux composés chimiques importants à partir des produits intermédiaires du métabolisme du glucose [89].

- **Métabolisme des lipides** : Bien que ce métabolisme ait lieu dans toutes les cellules de l'organisme, certains aspects apparaissent principalement dans le foie. Les fonctions spécifiques du foie dans ce métabolisme sont: un grand taux d'oxydation des acides gras pour fournir de l'énergie pour d'autres fonctions de l'organisme, la formation de la plupart des lipoprotéines, la synthèse de grandes quantités de cholestérol et phospholipides et la conversion de grandes quantités de glucose et protéines en lipides [89].

- **Métabolisme des protéines** : Les plus importantes fonctions du foie dans le métabolisme des protéines sont : la désamination des acides aminés, la formation de l'urée, la synthèse des protéines plasmatiques, des facteurs de coagulation et assure les interconversions entre les différents aminoacides et également entre les aminoacides et d'autres composés importants pour les processus métaboliques de l'organisme [89].

I-2-2- LES HEPATITES

I-2-2-1- Définition et classification

L'hépatite est une atteinte du foie caractérisée par une phase inflammatoire pouvant être aiguë ou chronique. Selon la cause de cette inflammation, on distingue deux grandes catégories d'hépatites :

- Les hépatites virales, causées par une infection par un virus. Cinq virus d'hépatite ont ainsi été identifiés chez l'Homme : le virus de l'hépatite A (VHA), le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'hépatite C (VHC), le virus de l'hépatite D (VHD) et le virus de l'hépatite E (VHE). Un autre virus transmissible par le sang a également été identifié dans certains cas d'hépatite chronique et est désigné GB-virus C ou virus de l'hépatite G (VHG). L'ensemble des connaissances montre cependant que ce HGV ne se réplique pas dans le foie et n'entraîne pas d'hépatite [1].
- Les hépatites non virales, principalement provoquées par les produits ou agents toxiques pour le foie. Elles peuvent être dues aux parasites (les schistosomes et plus principalement leurs œufs...), aux médicaments (paracétamol...), aux poisons ou à une consommation excessive d'alcool. On peut également y inclure l'hépatite auto-immune qui est une hépatite inflammatoire chronique d'origine obscure se caractérisant par la production d'auto-anticorps [1].

Le terme « maladie alcoolique du foie » (ALD), désigne une atteinte hépatique causée par une consommation excessive d'alcool. Selon de degré de sévérité, on note : la stéatose alcoolique, la stéatohépatite alcoolique (ASH) avec ou sans fibrose, la cirrhose alcoolique, l'hépatite alcoolique (AH) et le cancer hépatocellulaire (HCC) [96] ; [6].

Le terme « maladie du foie gras non alcoolique » (NAFLD), désigne une atteinte du foie caractérisée par une insulino-résistance et une nécroinflammation avec ou sans fibrose centrolobulaire. Selon la sévérité, elle va de la simple stéatose hépatique (« foie gras ») à la stéatohépatite non alcoolique (NASH) [96] ; [97].

I-2-2-2- Epidémiologie et distribution géographique

Les hépatites virales à l'origine des infections aiguës et/ou chroniques du foie représentent un important problème de santé publique dans le monde ; surtout l'hépatite virale B et l'hépatite virale C qui sont des causes majeures de morbidité

grave et de décès. En effet, on estime à 57% le nombre de cas de cirrhose du foie et 78% ceux du cancer primitif du foie, résultant d'une hépatite B ou C [98] ; [2] ; [99] ; [97], [100]. Par ailleurs, on compte environ deux milliards de personnes contaminées par le virus de l'hépatite B dans le monde dont plus de 350 millions présentant une atteinte chronique, un peu plus de 240 millions vivant avec l'infection et 500 000 à 700 000 qui meurent par an. Pour ce qui est de l'hépatite C, on compte environ 130 à 150 millions de porteurs chroniques (soit 3% de la population mondiale), 350 000 à 500 000 décès annuels dus aux maladies du foie liées à l'hépatite C et 4 millions de nouveaux cas chaque année [8] [2] ; [4] ; [25] ; [3]. En France, bien qu'une prévalence relativement basse soit enregistrée (environ 1,1% en 2004), on compte environ 5000 décès par an, liés aux hépatites virales chroniques. De plus, du fait que ces dernières soient la cause principale des cirrhoses et cancers de foie conduisant aux transplantations, elles constituent une lourde charge de santé publique [101] ; [102], [103].

L'hépatite C est présente partout dans le monde mais les plus fortes prévalences sont enregistrées en Afrique, particulièrement en Afrique du Nord et spécifiquement l'Égypte où on note la plus forte prévalence du monde (environ 15-20% atteignant les 24% dans certaines zones rurales) [104] ; [105] ; [5]. Les fortes prévalences sont également enregistrées en Asie centrale et Asie du Nord (avec une prévalence de 3,2% en Chine et 4,8% au Pakistan). Les plus faibles prévalences sont enregistrées en Amérique du Nord, en Australie et en Europe du Nord et de l'Est. C'est ainsi qu'on note 0,6% en Allemagne, 0,8% au Canada, 1,1% en Australie, 1,1% en France. Les prévalences moyennes ont cependant été enregistrées aux USA (1,8%), au Japon (1,5-2,3%) et en Italie (2,2%) [101].

Les plus fortes prévalences de l'hépatite B sont quant à elles enregistrées en Afrique subsaharienne et en Asie orientale. Cependant, des taux élevés d'infection chronique sont également notés en Amazonie et dans les parties méridionales d'Europe centrale et orientale. Au Moyen-Orient et le sous-continent indien, 2 à 5% de la population générale sont porteurs chroniques. En Europe occidentale et en Amérique du Nord, on ne compte plus que moins de 1% de porteurs chroniques [4] ; [3].

Après les hépatites virales, on note la maladie alcoolique du foie (incluant l'hépatite alcoolique), qui représente une cause majeure de morbidité et mortalité dans le monde [8], [11]. Dans les pays développés, elle est la seconde cause de maladies graves du foie, avec un développement de cirrhose chez plus de 5,5% de

personnes consommant de l'alcool en excès [106] ; [107], [108] [98], [99] ; [6]. Ainsi, l'hépatite alcoolique (AH) est une forme sévère de la maladie alcoolique du foie (ALD). C'est un syndrome caractérisé par une jaunisse, des lésions hépatocellulaires et une infiltration des cellules inflammatoires dans le foie. Retrouvée chez les grands buveurs, à environ 10% à 35%, elle se développe chez les patients ayant une stéatose et est habituellement associée à une fibrose progressive [6], [11], [107]. De plus, dans les pays industrialisés, on note également parmi les plus importantes causes des maladies chroniques du foie, la maladie du foie gras non alcoolique incluant la stéatohépatite non alcoolique (NASH) [96].

I-2-2-3- Prévention et traitement

- Prévention

En général, l'hépatite A n'est pas destinée à une évolution chronique, on ne note que rarement une évolution chronique de l'hépatite E et l'hépatite D ne s'observe que chez les patients infectés par le VHB ; ceci explique l'absence de traitements spécifiques pour ces hépatites. Cependant, une progression fatale de l'hépatite A peut être observée chez les séniors et les immuno-déficients. La stratégie de contrôle de la maladie passe ainsi par la vaccination. A l'heure actuelle, les vaccins existants sont disponibles contre l'hépatite A et l'hépatite B. Un premier vaccin contre l'hépatite E a été homologué par la Chine en 2012 et est susceptible de s'étendre dans d'autres pays. D'autres vaccins sont par ailleurs en essai. Par contre, il n'existe malheureusement pas de vaccin disponible contre l'hépatite C à ce jour, la prévention consiste ainsi à limiter l'exposition au virus chez les personnes à risque [109], [110] ; [3], [4], [97].

- Traitement

De toutes les hépatites virales, l'hépatite B et l'hépatite C sont les plus préoccupantes. D'où l'intérêt majeur que leur porte la recherche, pour une meilleure compréhension de la maladie et le développement de nouveaux traitements. A ce jour, il n'existe pas de traitement contre l'hépatite B aiguë car, la majeure partie des malades atteints d'une hépatite B aiguë guérie spontanément [97]. De plus, le traitement contre l'hépatite B chronique ne permet pas d'éradiquer complètement le virus mais aide à prévenir ou limiter l'évolution vers la cirrhose ou le cancer du foie presque toujours mortel. Cependant, lorsqu'un traitement est nécessaire [111] deux classes de composés sont utilisées pour le traitement de

l'hépatite B chronique: l'interféron alpha (sous sa forme standard ou pégylée) et cinq analogues de nucléotides/nucléosides (la lamivudine, la telbivudine, l'entecavir et l'adefovir). Tenant compte de leur efficacité et leur capacité à contrer le développement des résistances virales, l'entecavir et le tenofovir sont les deux analogues les plus puissants avec la plus grande barrière de résistance [111] ; [112]. Une nouvelle molécule (le myrcludex B) est par ailleurs en essai clinique et serait un potentiel médicament très intéressant au regard de sa remarquable stabilité et sa demi-vie d'environ 16 h chez la souris. Cette molécule permettrait de ce fait une seule application sous-cutanée une fois tous les deux jours [97].

Contrairement à l'hépatite B aiguë, l'hépatite C aiguë, bien qu'étant asymptomatique, est accompagnée d'un risque de progression chronique dans 80% des cas, ce qui fait que l'hépatite C aiguë est généralement traitée avec l'interféron alpha (standard ou pégylé) [10], [97]. Cependant, certaines personnes sont capables de combattre l'infection spontanément. Mais, lorsqu'il est nécessaire, le traitement contre l'hépatite C est curatif et le taux de réussite du traitement dépend de la souche virale concernée et du traitement donné au malade. Il est donc nécessaire d'évaluer la meilleure approche de traitement du malade avant tout traitement [3].

Six génotypes de l'hépatite C sont identifiés mais les génotypes 1-3 sont les plus importants et leurs traitements sont différents [97]. Le traitement antiviral de l'hépatite C a longtemps été basé sur l'interféron alpha, initialement utilisé seul en administration sous-cutanée trois fois par semaine. Ce traitement a été amélioré avec l'introduction de la forme pégylée de l'interféron alpha qui pouvait être administrée une fois par semaine en combinaison avec la ribavirine, une polymérase analogue de nucléoside. A ce jour, la première ligne de traitement de l'hépatite C chronique est la combinaison de l'interféron alpha pégylé et de la ribavirine. La dose de ribavirine et la durée du traitement dépendant de la souche virale. Cependant, il a été noté une réponse positive de cette combinaison chez moins de 50% de patients infectés par le génotype 1, ce qui traduit la nécessité de trouver de nouveaux traitements pour le génotype 1. Le développement de nouveaux modèles d'études et une meilleure compréhension du cycle de vie du virus ont permis le développement de nouvelles approches thérapeutiques visant essentiellement les composants viraux. Ces nouveaux médicaments sont les antiviraux directs (DAAs) plus puissants que la ribavirine et capables de bloquer une enzyme ou une protéine virale, ou encore bloquer les interactions entre les protéines hôtes et les composants viraux ; interactions essentielles pour le

développement du virus [10], [97]. En fonction de leur mécanisme d'action et de la cible thérapeutique, on distingue quatre classes de DAAs : les inhibiteurs de la protéase NS3-4A (PIs), les inhibiteurs de la polymérase nucléoside dépendant NS5B (NPIs), les inhibiteurs de la polymérase non nucléoside dépendant NS5B (NNPIs) et les inhibiteurs de la NS5A.

En 2011, le traitement du génotype 1 (qui présente la plus forte prévalence mondiale) a été approuvé. Il consiste en une triple combinaison de l'interféron alpha pégylé avec la ribavirine et la bocéprevir ou la télaprevir qui sont tous les deux des antiviraux directs (DAA) inhibiteurs de la protéase HCV non structurale 3-4A (NS3-4A) [10], [13], [114]. Ces nouveaux DAAs qui constituent la première génération d'inhibiteur de protéases (PI) ont permis d'atteindre des taux de guérison (SVR) de 75% pour la télaprevir et 67% pour la boceprevir. Cependant, ces traitements sont associés à de fréquents effets secondaires entraînant parfois l'arrêt du traitement chez 10-12% de malades, des interactions entre médicaments, une utilisation très peu pratique et une faible barrière à la résistance [10], [12]. Pour pallier à ces limites, plusieurs molécules sont en cours d'expérimentation. On note par exemple, la seconde génération des inhibiteurs de protéase qui montrerait une forte efficacité contre le génotype 1 mais aurait une efficacité limitée contre les autres génotypes (cas de la Simeprevir). On note également les inhibiteurs de la NS5A qui sont en règle générale puissants et efficaces contre tous les génotypes mais présenteraient une faible barrière à la résistance et des profils de toxicité variables (cas de la ledipasvir ou GS-5885 et du daclatasvir ou BMS-790052 qui auraient complété la phase 3 et présenteraient des résultats très prometteurs). De même, on note les NPIs (exemple de la sofosbuvir) qui, contre tous les génotypes, présentent de façon générale, une efficacité modérée à forte et une très forte barrière à la résistance. Malheureusement, ces NPIs présentent en outre une toxicité qui limite le nombre de molécules complétant la phase 3. On note également les inhibiteurs de la cyclophilin (B et/ou A) comme la Debio-025 (alisporivir) qui est en cours d'étude [12], [115].

Au-delà de tous ces DAAs en cours de développement et compte tenu du concept selon lequel l'interféron et la ribavirine ne sont pas absolument indispensables pour avoir un taux de guérison élevé, les traitements sans interféron alpha et sans ribavirine sont hautement désirés et seraient en cours de développement. Des études sur la combinaison de deux médicaments ou plus sans

interféron alpha ni ribavirine ont déjà montré une bonne efficacité contre le génotype 1b [12].

Par ailleurs, pour le traitement de l'hépatite alcoolique (AH) abordée précédemment, les corticoïdes (prednisolone) et la pentoxifylline constituent la première ligne de traitement de l'hépatite alcoolique sévère [9], [107], [108]. Cependant, tous les malades ne répondent pas à ces traitements, d'où la nécessité de développer de nouveaux traitements. Ces non-répondants ont comme solution thérapeutique : la transplantation d'un foie [11], [116].

I-3- LE STRESS OXYDANT- LES ANTIOXYDANTS ET LES HEPATITES

I-3-1- LE STRESS OXYDANT

I-3-1-1- Espèces réactives de l'oxygène (ERO/ROS).

Les ERO ou Espèces Réactives de l'Oxygène sont comme leur nom l'indique, des molécules qui contiennent de l'oxygène et qui sont très réactives. Sous ce terme général de « ERO » ou « ROS », on regroupe deux types de molécules : les radicaux libres et les non-radicaux [117] ; [118]. Les radicaux libres se définissent comme des molécules ou fragments de molécule contenant au moins un électron libre dans leur orbite atomique ou moléculaire. Ces électrons libres leur confèrent généralement une grande réactivité qui leur permet de se lier aux lipides, aux protéines ou à l'ADN et inhiber ainsi leur fonction normale [119]. Les non radicaux n'ont quant à eux, pas d'électrons libres mais sont chimiquement réactifs et peuvent être convertis en radicaux libres [118].

Parmi les ERO, on peut citer comme radical libre, l'anion super oxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH), le radical peroxy (RO_2), le radical alkoxy (RO), le radical hydroperoxy (HO_2) et l'oxygène singulet (1O_2). Comme non radical, on peut citer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux (HOCl), l'acide hypobromeux (HOBr), l'ozone (O_3), les peroxydes organiques (ROOH), l'acide peroxynitreux ($ONOOH^c$), le peroxynitrate (O_2NOO^-), le peroxynitrite ($ONOO^-c$) [117].

Les radicaux libres issus de l'oxygène représentent la classe des ERO la plus importante. En effet, l'oxygène moléculaire ou dioxygène a une configuration électronique unique. L'addition d'un électron au dioxygène forme le radical anion super oxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui, pouvant être issu soit des processus métaboliques soit de l'activation de l'oxygène, est considéré comme le ERO « primaire » à partir duquel est généré les ERO « secondaires » ; soit directement soit en majorité, à travers les

processus enzymatiques ou de métal catalysé, suite à des interactions avec d'autres molécules. La production de l'anion superoxyde a le plus souvent lieu dans la mitochondrie lors du transport des électrons dans la chaîne mitochondriale. Cette chaîne est la principale source d'ATP dans les cellules des mammifères et est donc essentielle pour la vie. Durant cette transduction de l'énergie, certains électrons se détachent prématurément de l'oxygène, formant ainsi le radical anion superoxyde qui a été impliqué dans la physiopathologie de diverses maladies [117], [119].

Le radical hydroxyle (OH) est la forme neutre de l'ion hydroxyde. Il a une grande réactivité qui fait de lui un radical très dangereux avec une demi-vie *in vivo* d'environ 10^{-9} secondes. Ainsi, quand il est produit dans l'organisme, OH[•] réagit près de son lieu de production [119].

D'autres ERO peuvent être produites par l'organisme, en l'occurrence les radicaux ROO[•]. Le plus simple étant le HOO[•] (acide conjugué, pKa d'environ 4,8) qui est la forme protonée du superoxyde et est habituellement appelé radical hydroperoxyde ou radical perhydroxyle. Etant donné son pKa, seul 0,3% environ du superoxyde présent dans le cytosol des cellules typiques est sous la forme protonée. Il a été démontré que le radical hydroperoxyde initie la peroxydation des acides gras de deux manières différentes : LOOH-dépendant et LOOH-indépendant. La voie LOOH-dépendant pourrait être associée aux mécanismes d'initiation de la peroxydation lipidique *in vivo* [119].

I-3-1-2- Espèces réactives de l'azote (ERN ou RNS)

Les ERN pour Espèces Réactives de l'Azote, sont des molécules qui contiennent l'azote et qui sont très réactives. Tout comme les ERO, on distingue parmi les « ERN » encore appelés « RNS », les radicaux libres et les non radicaux libres. Comme radical libre on peut citer l'oxyde nitrique (NO[•]), le dioxyde de nitrogène (NO₂) et le nitrite (NO₃). Comme non radical, on peut citer le chlorure de nitrile (NO₂Cl), l'acide nitreux (HNO₂), le cation nitrosyle (NO⁺), l'anion nitrosyle (NO⁻), le tétroxyde de dinitrogène (N₂O₄), le trioxyde de dinitrogène (N₂O₃), le peroxydinitrite (ONOO⁻), l'acide peroxydinitreux (ONOOH), les peroxydinitrites d'alkyle (ROONO), le cation nitronium (NO₂⁺) [117].

De même que l'anion superoxyde, le radical NO[•] est le principal RNS à partir duquel sont formés beaucoup d'autres. En effet, le NO[•] est une petite molécule contenant un électron libre. Sa demi-vie est de l'ordre de la seconde (ou moins) dans un environnement aqueux et sa stabilité est meilleure dans un environnement avec une teneur en oxygène faible. Il est généré par les oxydes nitriques synthétases

spécifiques appelées NOSs. Ces NOSs sont présentes sous trois formes différentes dans l'organisme, deux formes constitutives (nNOS et eNOS) et une forme inducible (iNOS). La NOS neuronale ou nNOS a été découverte pour la première fois dans le tissu neuronal et a été identifiée comme ayant un rôle important dans la contraction musculaire. La eNOS a quant à elle été découverte pour la première fois dans l'endothélium et joue un rôle vital dans la régulation du flux sanguin et de la pression artérielle. La iNOS, retrouvée dans plusieurs types de cellules, a été décrite pour la première fois dans les macrophages et les hépatocytes après traitement aux endotoxines et cytokines. Habituellement connue comme étant inducible, certaines études ont montré que la iNOS pouvait également être constitutive ; particulièrement dans les cellules épithéliales des voies respiratoires et des sinus nasaux. La nNOS et la eNOS sont calcium-dépendants alors que la iNOS, bien que se liant à la calmoduline, n'est pas calcium-dépendant [117].

Le NO° peut interagir avec plusieurs molécules comme les thiols, les métaux de transitions (à l'exemple du fer), l'oxygène et d'autres radicaux libres (comme l'O₂⁻). Son interaction directe avec les radicaux (autres que l'O₂⁻ ou O₂) ou avec les complexes métalliques (principalement ceux contenant le fer) conduit aux produits responsables de son effet direct. Cet effet direct du NO° est observé à faible concentration (nanomolaire) et implique les processus de régulation comme le contrôle du tonus musculaire, la fonction neuronale et la régulation des liaisons fer-protéines. A l'inverse, la réaction du NO° avec l'O₂ ou l'O₂⁻ produit des radicaux très fortement réactifs, capables de modifier un plus grand nombre de molécules comparé au NO° lui-même. Ces produits deviennent importants à une forte concentration du NO° (micromolaire) et conduisent aux effets indirects de celui-ci à travers les mécanismes nitrosatifs et oxydatifs. Dans ces conditions, l'orientation vers un stress oxydatif ou nitrosatif est fonction de l'intermédiaire formé et de l'environnement cellulaire [120].

C'est ainsi que l'interaction du NO° avec l'oxygène conduit à la formation d'autres RNS comme le dioxyde d'azote (NO₂) ou le trioxyde de dinitrogène (N₂O₃), celle avec le peroxydate à un taux de diffusion limité, conduit à la production du peroxy-nitrite (ONOO⁻) et celle avec l'eau, conduit à la formation de l'anion nitrite (NO₂⁻) [120] ;[117].

I-3-1-3- ERO/ ERN et le stress oxydant

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN) sont des produits issus du métabolisme cellulaire normal de l'organisme. Leur rôle a été reconnu à différents niveaux de la signalisation cellulaire. Ils ont été décrits comme étant le premier stimulus nécessaire pour déclencher la cascade d'événement lors de la transduction du message cellulaire (initiateur). Ils ont également été décrits comme nécessaires lors de la dernière étape de la transduction du signal (effecteur) mais également comme molécules relais ; en étant soit directement second messenger soit promoteur d'une étape de la transduction. Ainsi, pour que les ERO/ERN soient bénéfiques il faut qu'ils soient produits à l'endroit et au moment où ils sont nécessaires ensuite, ils doivent rapidement être éliminés pour arrêter le signal [121] ; [118].

Du fait de cette capacité à être soit bénéfique soit néfaste, il est attribué aux ERO/ERN un rôle mixte, bénéfique ou délétère en fonction de leur concentration dans l'organisme. L'effet bénéfique des ERO/ERN est donc noté à une concentration modérée à faible. Ils peuvent ainsi participer à la réponse cellulaire en situation d'hypoxie, à la défense de l'organisme contre les agents infectieux, à l'induction de la réponse mitogénique et dans bien d'autres processus physiologiques normaux. A l'inverse, l'effet délétère des ERO/ERN est noté suite à une surproduction de ceux-ci et/ou une déficience des antioxydants qui constituent leur système de régulation. Cette surproduction des ERO/ERN entraîne des dommages se manifestant entre autres, par une peroxydation des lipides, une destruction des protéines ou de l'ADN. Ce déséquilibre entre les ERO et les antioxydants au profit des ERO est appelé, stress oxydatif. Par analogie au stress oxydatif, le terme « stress nitrosatif » fait référence à une surproduction ou une dérégulation des ERN [122] [123] ; [119] ; [117].

I-3-2- LES ANTIOXYDANTS

I-3-2-1- Définition et classification

L'organisme, pour remédier aux effets du stress oxydatif et nitrosatif, a développé des stratégies de défenses qui englobent les mécanismes de prévention du stress oxydatif, les mécanismes de réparation des dommages, les mécanismes de défense physique. Ainsi, pour consommer ou limiter l'excès de ERO/ERN, l'organisme a recours aux antioxydants. Parmi ces antioxydants on distingue les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non-enzymatiques. Les défenses

enzymatiques incluent la superoxyde dismutase (SOD), le glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT). Les défenses non-enzymatiques incluent la vitamine E (encore appelée α -tocophérol), la vitamine C (encore appelée acide ascorbique), le glutathion (GSH), les flavonoïdes, les caroténoïdes et d'autres agents antioxydants exogènes [119].

La superoxyde dismutase (SOD) est le chef de file des défenses antioxydantes enzymatiques, particulièrement contre l'anion superoxyde. Elle catalyse la réaction entre deux anions superoxydes, conduisant ainsi à la formation d'une molécule d'oxygène moléculaire (O_2) et d'une molécule de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette molécule de H_2O_2 sera ensuite prise en charge par le glutathion et la catalase. Il a été identifié chez les mammifères, trois isoformes de la SOD : la SOD1, la SOD2 et la SOD3. La SOD1 et la SOD3 contiennent le cuivre et le Zinc sur leur site catalytique et ont une localisation soit intracellulaire (SOD1 ou CuZn-SOD) soit extracellulaire (SOD3 ou EC-SOD). La SOD2 (MnSOD) a quant à elle comme cofacteur, le manganèse et est localisé dans la mitochondrie des cellules aérobiques. Dans sa localisation intracellulaire, la SOD1 est retrouvée dans le cytoplasme, le noyau et les lysosomes des cellules des mammifères. La SOD3 dont l'expression est restreinte aux cellules et tissus spécifiques où son activité est supérieure à celle de la SOD1 et SOD2, est la plus récemment découverte et la moins bien caractérisée des SODs [117], [124].

Le glutathion (GSH) est un tripeptide ubiquitaire dont la fonction principale est de réagir avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour produire le glutathion dissulfide (GSSH) sous l'action du glutathion peroxydase. Le rôle du GSH est également, de piéger le radical hydroxyle (OH^\bullet) et l'oxygène singulet (1O_2), de chélater le fer, de prévenir l'oxydation des groupes sulfhydryles des protéines et de participer au transport des acides aminés à travers la membrane [117].

En complément du GSH, la catalase (CAT) et les peroxydases agissent pour transformer le peroxyde d'hydrogène en un métabolite moins réactif. Ainsi, la catalase convertit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et oxygène (O_2) pendant que la peroxydase est capable de la réduire en eau [117].

Hormis les antioxydants produits par l'organisme (antioxydants endogènes), il existe d'autres antioxydants qui, du fait qu'ils proviennent de l'alimentation, sont qualifiés d'« exogènes ». Ce sont généralement de petites molécules capables de prévenir ou limiter les dommages causés par les ERO/ERN. On peut ainsi citer : la

vitamine C (acide ascorbique ou ascorbate), la vitamine E (α -tocophérol), les caroténoïdes (source de la vitamine A), certains oligo-éléments et les phénols des plantes (flavonoïdes...)[117].

I-3-2-2- Oligo-éléments – stress oxydatif/nitrosatif et antioxydants

Les oligo-éléments sont des nutriments de nature minérale qui, à très faible dose, sont nécessaires à la vie d'un organisme. En général, ils sont qualifiés d'actifs (Cu et Fe) ou inertes (Zn) selon qu'ils participent directement ou non aux réactions d'oxydo-réductions. Les oligo-éléments redox comme le zinc, le cuivre, le sélénium ou le manganèse jouent le rôle de cofacteurs pour les antioxydants enzymatiques (Zn, Cu, Se, Mn). Ils exercent par ce biais une activité antioxydante indirecte. Toutefois, de même qu'il est important de maintenir un équilibre entre les éléments pro-oxydants et les éléments antioxydants en général, il est nécessaire de maintenir la délicate balance qui existe pour les oligo-éléments redox. Bien qu'étant bénéfique en agissant comme cofacteur d'enzyme antioxydante (CuZn- SOD), certains oligo-éléments à l'exemple du cuivre peuvent, de par leur potentiel redox élevé, initier les réactions des radicaux libres [25] ; [125] et entraîner de ce fait un effet néfaste pour l'organisme.

Ainsi, les oligo-éléments redox peuvent exprimer leur potentiel antioxydant à travers différents mécanismes. C'est ainsi que le zinc, métal redox inerte, illustre son potentiel antioxydant à travers sa capacité : à antagoniser les molécules redox actives comme le fer et le cuivre, à se lier aux groupes sulhydryles des protéines pour empêcher leur oxydation et à moduler les métallothionéines (GSH et Nrf2) capables de protéger l'organisme contre le stress oxydatif. Par ailleurs, les concentrations du sélénium et du cuivre dans les érythrocytes peuvent améliorer l'effet antioxydant oligo-éléments-dépendant [25] ; [125].

De même, le manganèse est un des éléments clés pour les enzymes lors de la production de l'énergie et la défense antioxydante [126]. Il est important lors de la dégradation des acides aminés et est essentiel pour le métabolisme de la vitamine B1, C et E et pour l'activation de diverses enzymes importantes pour la digestion.

Le fer, quant à lui, est un oligo-élément aux fonctions biologiques importantes car il intervient dans la production de l'hémoglobine et des globules rouges. Cependant, tout comme le cuivre, il présente de par son potentiel redox élevé, un potentiel pro-oxydant avec un effet radical libre qui conduit à la destruction des

membranes des cellules hépatiques et d'autres tissus [125]. Certaines études ont cependant montré l'effet bénéfique du fer contre le virus de l'hépatite C [127]–[129]. Cet oligoélément aurait donc un rôle ambivalent.

I-3-3- LES HEPATITES - LE STRESS OXYDANT/NITROSANT - LES ANTIOXYDANTS

I-3-3-1- HEPATITES ET STRESS OXYDANT/NITROSANT

Le stress oxydant a été impliqué dans plusieurs maladies humaines parmi lesquelles les maladies hépatiques. D'une façon générale, le stress oxydatif et/ou nitrosatif est néfaste pour l'homéostasie hépatique ; tant il affecte toutes les cellules du foie, initie et régule la transcription et l'activation des séries de médiateurs dont les signaux convergent tous vers des mécanismes de destruction du foie (apoptose, nécrose, inflammation, réponse immunitaire, fibrose, ischémie, altération des gènes et régénération...). La prévalence et la persistance d'un ou plusieurs de ces processus peut influencer l'apparition de différents types de maladies hépatiques [130] ; [117]. C'est ainsi qu'au cours des différentes pathologies hépatiques (la maladie alcoolique du foie (ALD) dont l'hépatite alcoolique (AH), la maladie non alcoolique du foie dont la NASH, l'ischémie reperfusion, hépatites virales...), il a été noté une augmentation de la production des radicaux libres et/ou une diminution significative des défenses antioxydantes [131]–[134]. Lors des hépatites virales, les dommages cellulaires sont à prédominance déterminés par la réponse immunitaire et bien que la physiopathologie soit complexe, plusieurs études ont démontré que la persistance de l'infection, la progression des dommages hépatiques et la carcinogenèse sont toutes, des étapes qui impliquent les radicaux libres [131], [135].

Suite à une exposition aiguë ou chronique des hépatocytes aux substances toxiques (poison, alcool, médicaments ...), les mitochondries ont été identifiées comme étant les principales sources de production des ERO/ERN à travers la chaîne respiratoire et les déshydrogénases mitochondriales (les enzymes du cytochrome P450). Paradoxalement, les mitochondries représentent également la principale cible de ces molécules réactives. Les cellules de küpffer et les cellules inflammatoires dont les neutrophiles en particulier représentent une autre source de production des ERO. Ces derniers, générés par les neutrophiles, migrent dans les hépatocytes et potentialisent le passage de l'apoptose à la nécrose [130] ; [25].

I-3-3-2- APPROCHES THÉRAPEUTIQUES DES HÉPATITES PAR LES ANTIOXYDANTS

A travers différents mécanismes moléculaires, l'infection par le virus de l'hépatite entraîne une diminution des défenses antioxydantes ; favorisant de ce fait l'apparition du stress oxydatif dans l'organisme. Au niveau cellulaire, la mitochondrie apparaît comme la principale source de production des radicaux libres et également comme l'organite le plus affecté par le stress oxydatif et la dérégulation de l'homéostasie des métaux. Ainsi, plusieurs molécules ont été étudiées pour leurs propriétés antioxydantes générales (vitamine E, vitamine C, N-acétylcystéine) ou ciblant spécifiquement la mitochondrie (mitoquinone ou MitoQ). Cependant, malgré leur capacité à diminuer le stress oxydant, elles n'étaient pas capables (ou ne l'étaient que très peu) de diminuer la charge virale lorsqu'utilisées seules [136], [137].

Toutefois, une classe de molécules antivirales à activité antioxydante et mitochondriale, présentant un intérêt croissant, a été identifiée. Ce sont des analogues de la cyclosporine A (CsA) à l'exemple des inhibiteurs de la cyclophilline A [138]–[145]. Ne présentant pas de propriétés immunosuppressives, ces molécules présentent un grand potentiel antiviral. L'Alisporivir ou Debio-025 ou DEB025 est le prototype de cette classe de molécule. Seule ou en combinaison avec l'interféron alpha pégylé, la Debio-025 a montré une activité antivirale chez les patients infectés par les génotypes 1 à 4 [114], [115], [146]–[151]. Elle a en plus démontré une habileté à prévenir le dysfonctionnement mitochondrial et la résultante surproduction des espèces réactives d'oxygène (ERO)[152]. Un autre inhibiteur de la cyclophilline A, la SCY-465 (Scynexis) est en cours de développement clinique. Mais, étant donné que les inhibiteurs de la cyclophilline constituent une approche thérapeutique orientée vers l'hôte, il persiste un risque de toxicité cellulaire de l'hôte, ce qui rend leur utilisation difficile en clinique ; bien que les différentes expérimentations aillent dans cette direction [25], [114].

Par ailleurs, les polyphénols naturels ont présenté une capacité à contrer le virus à différents stades de son cycle de développement (entrée du virus dans la cellule hôte, réplication virale ou la propagation du virus). Un grand intérêt a ainsi été porté à l'activité antivirale des puissants antioxydants que sont la quercétine, la (-)-Epigallocatechine-3-gallate (EGCG) et la silymarine. Il en est sorti, une activité antivirale de la (-)-Epigallocatechine-3-gallate (EGCG) (qui inhibe l'entrée du virus),

de la quercétine (qui inhibe la réplication du virus) et de la silymarine (qui pourrait bloquer l'entrée du virus, inhiber la propagation du virus ou bloquer la formation du virion en altérant le métabolisme de la cellule hôte infectée) [114], [153]–[155]. Le traitement antioxydant des affections du foie a également porté sur la voie du NO, (oxyde nitrique) l'expression des cytokines et la thérapie génique d'oxydoréduction [130].

Plusieurs études ont été faites pour évaluer le bénéfice des antioxydants (vitamine E, silymarine...) contre l'hépatite alcoolique. Certaines évaluaient l'effet d'un antioxydant administré seul et d'autres la combinaison d'antioxydants et de corticoïdes. Malheureusement, les antioxydants administrés seuls n'ont pas montré une augmentation du taux de survie des patients ayant une hépatite alcoolique [11], [131], [156], [157]. Cependant, le bénéfice potentiel de la combinaison du N-acetylcysteine avec des corticoïdes a été évalué. Il en est sorti une augmentation du nombre de patients survivants sur une courte période, après traitement avec la combinaison des deux molécules [6], [158]–[160].

Compte tenu de toutes leurs différentes capacités, les molécules antioxydantes ciblant spécifiquement la mitochondrie ou non, présentant une activité antivirale et/ou de chélateur de métaux, pourraient être utiles pour lutter contre les hépatites en général. Une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action pourrait ouvrir des pistes intéressantes pour le développement de nouvelles thérapies avec moins d'effets secondaires et une plus grande tolérance [137].

I-4- QUELQUES MODELES EXPERIMENTAUX DES HEPATITES

I-4-1- MODELES EXPERIMENTAUX DE L'HEPATITE VIRALE B ET C

Le chimpanzé (*Pan troglodytes*) est connu pour sa sensibilité aux virus des hépatites humaines et représente le seul modèle animal primate pour l'hépatite B. Comme les patients humains infectés par le virus de l'hépatite B, le chimpanzé peut développer une hépatite B aiguë ou chronique, suite à une infection par le virus de l'hépatite B. Il est également capable de développer une réponse immunitaire similaire à celle observée chez les malades humains. Pour ces raisons, le chimpanzé représente un modèle animal primate précieux pour la compréhension de la pathogenèse de l'hépatite B, pour le développement de nouvelles stratégies prophylactiques et pour l'évaluation de nouveaux traitements antiviraux [161]. De

même, le chimpanzé est le seul animal naturellement sensible à l'infection par le virus de l'hépatite C. Cependant, compte tenu des contraintes inhérentes à l'utilisation de ces gros animaux (disponibilité limitée, coût élevé, hétérogénéité génétique, considérations éthiques...) les expérimentations sur les chimpanzés sont limitées. Plusieurs approches expérimentales ont été développées pour la mise au point de modèles fiables *in vitro* ou sur des animaux plus petits [162].

Les souris étant plus accessibles et plus faciles d'utilisation, l'une des approches a consisté à rendre les souris sensibles à l'infection par le virus de l'hépatite C ou B en transplantant des hépatocytes humains chez la souris immunodéprimée. A partir de cette approche, il a été construit un modèle de souris dites génétiquement « humanisées » pour l'hépatite C [163]. Il a été rapporté un nouveau modèle d'hépatite B *in vitro* utilisant les souris « humanisées » et impliquant le peptide cotransporteur du sodium taurocholate (NTCP), exprimé dans le foie et identifié comme étant un récepteur important pour l'entrée du virus de l'hépatite B dans la cellule [164], [165].

Plusieurs autres modèles *in vitro* existent et impliquent l'utilisation de particules pseudo virales ou « viral like particles » (VLPs) sur des cellules [166].

I-4-2- MODELES EXPERIMENTAUX DES HEPATITES NON VIRALES OU TOXIQUES

Compte tenu du caractère pluricausal des hépatites non virales, leur étude nécessite différents modèles expérimentaux pour mimer les différentes interactions impliquées dans le développement de chacun des types d'hépatite non virale. Parmi les modèles les plus couramment utilisés, on compte le modèle d'hépatite au tétrachlorure de carbone (CCl₄), le modèle d'hépatite à la concanavalin A (ConA), le modèle d'hépatite au paracétamol (APAP) et le modèle d'hépatite à la lipopolysaccharide (LPS) et ses variantes (lipopolysaccharide (LPS)/galactosamine (GalN)...).

Le modèle CCl₄ est un modèle radical-libres dépendant caractérisé par une production de radicaux libres responsables des lésions nécrotiques dans le foie. Ces radicaux libres issus de la bioactivation du CCl₄, initient la peroxydation lipidique et entraînent l'activation des cellules de kuppfer accompagnée d'une production de médiateurs pro inflammatoires. La bioactivation du CCl₄ passe par le Cytochrome

P450 et conduit à la libération du radical CCl_3° très réactif puis au radical $\text{CCl}_3\text{OO}^\circ$ encore plus destructeur [167].

Le modèle ConA, mime l'hépatite auto-immune et est bien établi comme un modèle d'hépatite lymphocytes T dépendant. Il est caractérisé par une accumulation des CD4^+ , une implication des cellules de kuppfer et une intervention de plusieurs cytokines. Les lymphocytes T et les NKT exercent leur effet cytotoxique à travers les cellules hépatiques. En réponse à l'agent toxique, les cellules de kuppfer sont activées et produisent une grande quantité de $\text{TNF}\alpha$ qui activera les lymphocytes T et les NKT. Les cellules T activées produisent à leur tour l' $\text{IFN}\gamma$ qui, avec le $\text{TNF}\alpha$ induira le stress oxydatif et les dommages associés [168], [169].

Le modèle paracétamol est un modèle cliniquement relevant, bien étudié et rapidement inductible *in vivo* avec une dose unique. Toutefois, les rats sont connus pour être résistants aux effets délétères d'une forte dose de paracétamol. En effet, le paracétamol est un analgésique et antipyrétique couramment utilisé. A dose thérapeutique, environ 90% du paracétamol administré est métabolisé par glucuronidation et sulphation et ses métabolites sont excrétés via le système rénal. Deux pour cent du paracétamol restant est excrété intact dans les urines et environ 8% est métabolisé par le cytochrome P450 pour donner le N-acetyl-p-benzo-quinone imine (NAPQI), fortement réactif. Dans ces conditions thérapeutiques, le glutathion hépatique assure une excrétion sécurisée du paracétamol. A dose toxique, le glutathion est épuisé, laissant libre cours aux effets délétères du NAPQI. Ce dernier peut ainsi induire un dysfonctionnement mitochondrial conduisant à la diminution de la synthèse d'ATP, la destruction des membranes cellulaires et éventuellement la mort cellulaire [170], [171].

Le modèle LPS ou endotoxine peut utiliser le LPS seul ou en combinaison avec d'autres hépatotoxines comme la galactosamine (GalN). Pour induire son effet toxique, l'endotoxine est reconnue par la « LPS-binding protein ». Le complexe formé par les deux se lie au « lymphocyte antigen 96 » (MD2) et au récepteur CD14, ce qui entraîne son activation. Le complexe ainsi activé induit la cascade d'événements intracellulaires impliquant un réseau complexe et conduisant à l'inflammation. Le signal le plus important est l'activation de la voie NF-kappa B et la production des cytokines pro inflammatoires [172].

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre décrit le procédé de préparation des différents extraits de *Neoboutonia velutina*. Il présente les cellules et les animaux utilisés pour atteindre nos objectifs, récapitule les différentes méthodes utilisées pour dresser le profil phytochimique et toxicologique des extraits de *Neoboutonia velutina*. De plus, il présente d'une part la méthodologie d'évaluation du potentiel antioxydant des extraits et d'autre part, les différents modèles expérimentaux utilisés pour évaluer l'efficacité des extraits sur les cellules et chez la souris. Par ailleurs, il décrit le procédé de purification de l'extrait aqueux.

II-1- MATERIEL BIOLOGIQUE

II-1-1- Récolte de la plante

Les écorces de *Neoboutonia velutina* ont été récoltées en Octobre 2009, 2010 et 2011, dans une banlieue de Yaoundé, dans la région du Centre Cameroun. L'identification de la plante s'est faite à l'Herbier National du Cameroun par comparaison à l'échantillon n° 6711 SRFcam, répertorié sous le nom *Neoboutonia velutina* et précédemment récolté et identifié par Letouzey. Deux types d'extraits ont été préparés à partir de ces écorces : un extrait éthanolique visant à mimer la préparation traditionnelle et un extrait aqueux.

II-1-2- Cellules et culture cellulaire

Deux lignées cellulaires commerciales ont été utilisées dans le cadre de cette étude: la lignée cellulaire HepG2 [173] et la lignée cellulaire HepaRG (Rumin Gripon) [174]. Les cellules de ces deux lignées sont issues du carcinome hépatocellulaire humain et sont adhérentes. Toutefois, elles présentent des caractéristiques différentes. Les cellules HepG2 sont capables de se multiplier indéfiniment sans aucune possibilité de différenciation cellulaire. A l'inverse, les cellules HepaRG présentent un haut potentiel prolifératif mais une fois à confluence, elles sont capables de se différencier en hépatocytes et cellules biliaires, sans aucune possibilité de multiplication après différenciation.

Ainsi, les cellules HepG2 et HepaRG, ont été cultivées en incubateur, dans des flasques de 150 cm², à une température de 37°C et une teneur en CO₂ contrôlée (5%). Le milieu de culture des HepG2 était constitué du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal non décomplémenté et 1% d'antibiotiques (10000 unités/mL de pénicilline et 10000 µg/mL de streptomycine). Le milieu de culture des HepaRG était composé du milieu

de William's E sans L-glutamine, supplémenté avec 10% de sérum de veau décomplémenté, 1% d'antibiotiques (10000 unités/mL de pénicilline et 10000 µg/mL de streptomycine), 1% de glutamine, 0,1% d'hydrocortisone et 0,1% d'insuline. Les différents milieux de culture étaient renouvelés 3 fois par semaine : lundi, mercredi et vendredi. Les cellules HepG2 étaient maintenues en permanence dans l'incubateur tandis que les cellules HepaRG étaient mises en culture un mois avant l'expérimentation.

Le passage des cellules se faisait avant la confluence pour les HepG2 et après différenciation en hépatocytes, pour les HepaRG. Pour passer les cellules, le milieu de culture était retiré des flasques à l'aide d'une pipette pasteur reliée à une pompe à vide. Les cellules étaient ensuite lavées avec du PBS (« Phosphate Buffered Salin ») préalablement porté à 37°C. Elles étaient décollées du fond de la flasque par dépôt de 5 mL de trypsine-EDTA. La flasque était ensuite placée dans l'incubateur pendant 5 min environ. Au bout des 5 minutes, 5 mL de milieu de culture étaient rajoutés. Les cellules étaient ensuite individualisées au maximum par des mouvements d'aspirations-refoulements avec une pipette. Pour les différentes expérimentations, les cellules parfaitement individualisées étaient comptées à l'aide d'une cellule de Thoma.

II-1-3- Animaux d'expérimentation

Les souris C57BL/6, de sexe mâle, âgées de 6 semaines et de poids sensiblement égal à 25 g étaient fournies par un éleveur professionnel (Janvier Labs) et maintenues dans des conditions environnementales standard, avec 12 h de lumière et 12 h d'obscurité. Elles avaient libre accès à l'eau et à la nourriture. Une période de quarantaine de 7 jours était observée avant chaque expérimentation.

Les souris blanches de souche BALB/C, de sexe mâle, âgées de 90 jours environ et pesant environ 25 g, étaient élevées à température ambiante, dans une animalerie du laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I, avec 12 h de lumière et 12 h d'obscurité. Elles avaient libre accès à l'eau et à la nourriture. Leur aliment était composé de farine de maïs (47 %), farine de blé (15 %), farine de poisson fumé (15 %), farine d'os (1 %), tourteaux de palmiste (1,1 %), farine de soja (20 %), sel de cuisine (0,8 %).

II-2- PREPARATION DES EXTRAITS

Les écorces récoltées ont été séchées à l'ombre puis broyées. La poudre obtenue a été macérée soit dans de l'eau pendant 24 h (100 g de poudre pour 1 litre d'eau distillée) pour l'extrait à l'eau, soit dans l'éthanol 95° pendant 48 h (100 g de poudre pour 1 litre d'éthanol à 95°) pour l'extrait à l'éthanol. Les solutions obtenues après macération ont été filtrées et les filtrats ont été lyophilisés (extrait aqueux), ou concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif (40°C, 82 mbar, 109 tours) puis séchés au dessiccateur mécanique (extrait éthanolique). Les extraits totaux concentrés se présentaient sous forme de pâte marron. Pour les différentes expérimentations, les pâtes étaient reprises dans le solvant approprié (eau, PBS ou éthanol) et aux concentrations souhaitées. Les rendements d'extraction étaient de 11% (extrait aqueux) et 1% (extrait à l'éthanol) (Figure 5).

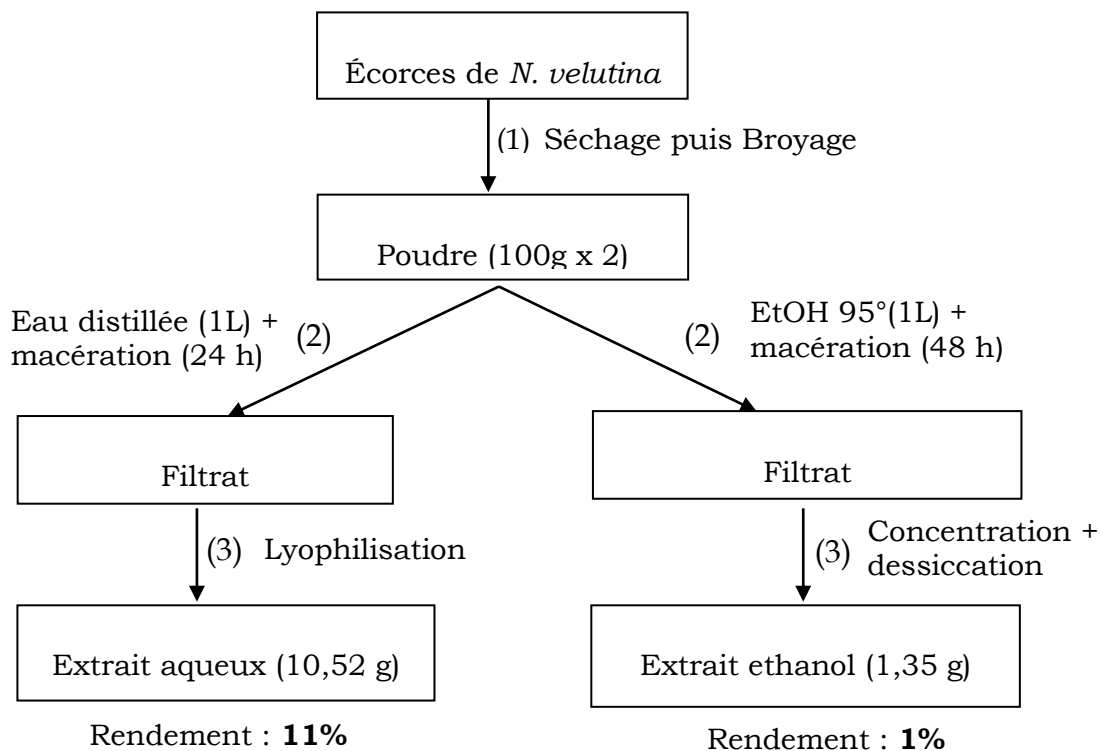


Figure 5 : Schéma de préparation des extraits totaux de *N. velutina*

II-3- PROFIL PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS DE *N. VELUTINA*

II-3-1- Analyses qualitatives

Dans le but de mettre en évidence les composés supposés bioactifs dans les extraits de *N. velutina*, des tests phytochimiques analytiques ont été faits.

- Test des polyphénols

A 2 mL d'une solution d'extrait (50 mg/mL), il a été ajouté une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. Une coloration bleu-noirâtre ou vert plus ou moins foncé témoignait de la présence des polyphénols [175].

- Test des alcaloïdes

Dans 6 mL d'alcool à 60°, a été repris 0,2 g d'extrait. A cette solution, il a été ajouté 2 gouttes du réactif de Dragendorf. L'apparition d'un précipité ou une coloration orangée était signe de la présence des alcaloïdes [175].

- Test des tannins

Dans 5 mL d'eau (extrait aqueux) ou 5 mL d'éthanol 95° (extrait éthanolique), 0,5 g d'extrait a été dissout. Après incubation à 40-45° au bain-marie pendant 2 minutes, les solutions ont été filtrées et 4 gouttes de chlorure ferrique à 5% ont été ajoutées à chaque filtrat. Une coloration vert-sombre témoignait de la présence des tannins [175].

- Test des stérols et polyterpènes

La mise en évidence des stérols et polyterpènes a été faite à partir de la réaction de Lieberman-Buchard. Un gramme d'extrait a été dissout à chaud dans 1mL d'anhydride acétique puis, 0,5 mL d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré y ont été coulés. L'apparition d'une coloration violette virant ensuite au bleu puis au vert était signe de la présence des stérols et polyterpènes [175].

- Test des glycosides

Un gramme d'extrait a été dissout dans 5 mL d'une solution de HCl 5% puis neutralisé avec 5 mL de NaOH 5%. Quelques gouttes d'une solution de la liqueur de Fehling ont ensuite été ajoutées au mélange. La formation d'un précipité rouge brique était caractéristique de la présence des glycosides [175].

- **Test des saponines**

Dans 5 mL d'eau distillée (extrait aqueux) ou 5 mL d'éthanol 95° (extrait éthanolique), 0,5 g d'extrait a été dissout. Après homogénéisation, la solution était ensuite vigoureusement agitée puis chauffée jusqu'à ébullition. La formation d'une mousse stable persistant pendant 1h était indicative de la présence de saponines [175].

- **Test des lipides**

Sur du papier filtre, ont été déposées quelques gouttes de la solution d'extrait. Le papier était ensuite séché à température ambiante. La présence de tâches translucides aux sites de dépôt des gouttes était révélatrice de la présence des lipides [175].

II-3-2- Analyses par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) analytique

Principe

La chromatographie sur couche mince est une méthode couramment utilisée en phytochimie. Son principe, qui est celui de toute chromatographie, repose sur la séparation de mélanges en leurs divers composants. Elle se base sur la différence d'affinité des composants à l'égard de deux phases : la phase stationnaire solide (qui fixée sur une plaque, peut être la silice, la cellulose, l'alumine ou le polyamide...) et la phase mobile qui est un solvant ou un mélange de solvant. La CCM est d'utilisation très simple et s'effectue à des fins surtout analytiques d'un mélange. Elle permet de recourir très facilement à des réactifs chimiques pour la détection, la caractérisation et l'augmentation du seuil de détection de certaines molécules.

Mode opératoire

Généralement, une petite quantité de l'échantillon à étudier est déposée sur la phase fixe et mise au contact de la phase mobile. Celle-ci migre par capillarité du bas vers le haut, entraînant avec lui les composants de l'échantillon. Cette migration est appelée élution et permet la séparation des différents composants de l'échantillon. Chaque composant migre à une hauteur donnée et le rapport entre la distance parcourue par le composant et celle parcourue par la phase mobile est appelé rapport frontal (Rf), caractéristique de chaque molécule.

Les extraits aqueux et éthanolique de *N. velutina* ont été dissouts dans le méthanol (extrait éthanolique) ou le mélange eau/méthanol 60:40 (extrait aqueux) à une concentration finale de 50 mg/mL. A l'aide d'un tube capillaire, 50 µL de chacun des extraits était déposé sur une plaque finie de silice 60 F₂₅₄ prête à l'emploi. La plaque après séchage du dépôt, était éluée dans un mélange eau/méthanol/acide acétique (12,5/12,5/1) pour l'extrait aqueux et un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (50/50) pour l'extrait éthanolique. Après élution et séchage des plaques, celles-ci étaient révélées soit en UV aux longueurs d'onde de 254 et 366nm soit à l'aide de révélateurs chimiques comme l'indique le tableau I.

Tableau I : Récapitulatif des révélateurs de plaques de CCM

Réactifs	Composés révélés	Mode opératoire
Anisaldéhyde sulfurique [176]	Réactif polyvalent	Une solution de p-anisaldéhyde à 0,5% a été préparée dans un mélange de méthanol/acide acétique/acide sulfurique (85 :10 :5). Puis pulvérisée sur la plaque. Après un chauffage intense, les composés organiques apparaissent sur la plaque sous forme de taches colorées en lumière du jour.
Dragendorff modifié selon Munier [177]	Alcaloïdes	Un volume d'une solution de 17g de soutriate de bismuth et 200 g d'acide tartrique dans 800 mL d'eau a été mélangé avec un volume d'une solution de 160 g d'iodure de potassium dans 400 mL d'eau. Cinquante millilitres de cette solution ont été dilués extemporanément dans 500 mL d'eau. Cent grammes d'acide tartrique ont ensuite été dissouts dans la dilution qui était pulvérisée sur la plaque.
Perchlorure de fer [178]	Polyphénols	Une solution de FeCl ₃ à 10% a été préparée dans un mélange méthanol/eau (1:1) puis vaporisée sur la plaque. Les polyphénols apparaissent sous forme de taches de couleur en lumière du jour.
Neu [178]	Flavonoïdes	Une solution de diphenylborate d'éthanolamine à 1% a été préparée dans le méthanol. Cinq pour cent de PEG 4000 (polyoxyéthylène glycol 4000) y ont été ajoutés et la solution, vaporisée sur la plaque. Les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes orange, jaune, bleu et vert à 366 nm.
Diméthylamino-cinnamaldehyde (DMACA)	Proanthocyanidines (tannins cathéchiques)	Deux grammes de p-diméthylaminocinnaldéhyde ont été dissouts dans 100 mL de méthanol puis 3,5 mL d'acide chlorhydrique concentré y ont été ajoutés. Le mélange a été vaporisé sur la plaque. Les tannins apparaissent sous forme de taches vertes (catéchines) ou bleues (proanthocyanidines) selon leur nature chimique.
1,1-diphenyl-2-picrylhydrazole (DPPH) [179]	Composés anti-radicalaires	Une solution méthanolique de DPPH a été préparée à 2mg/mL et la plaque était trempée dans la solution pendant 5 secondes. Les composés anti-radicalaires apparaissaient en jaune sur la plaque.

II-3-3- Chromatographie Liquide sous Haute Pression

Principe et description du dispositif

Globalement, la Chromatographie Liquide sous Haute Pression (CLHP) repose sur le même principe que la CCM qui consiste en la séparation de mélanges en leurs divers composants en fonction de leur affinité pour les différentes phases (mobile et stationnaire). Au-delà de son coût plus élevé, de sa complexité d'utilisation, de la nécessité de prendre davantage de précautions ; son avantage est l'amélioration de la résolution et du seuil de détection des composés. Les éléments constituant un système CLHP classique sont : un système de pompage pouvant être simple ou multiple et servant à déplacer la phase mobile à haute pression (2-300 bars); un injecteur pouvant être manuel ou automatique et servant à introduire dans le système à haute pression, l'échantillon préalablement filtré (pour éviter de boucher les colonnes); une colonne à granulométrie très fine contenant la phase stationnaire et responsable de la bonne résolution de la CLHP; un détecteur ultraviolet et une interface de visualisation des signaux enregistrés par le détecteur.

Mode opératoire

Les extraits totaux de *N. velutina* dissouts dans le méthanol (extrait éthanolique) ou le mélange eau/méthanol 60:40 (extrait aqueux) à une concentration finale de 50 mg/mL, ont été filtrés à 0,45 micron puis injectés dans un système CLHP de marque shimadzu, composé de deux pompes LC-10AS, d'un détecteur UV SPD-10AS à deux longueurs d'onde et d'un module de contrôle 10A ν p. Tous ces éléments étaient pilotés à travers le logiciel LC solution grâce auquel on pouvait visualiser le chronogramme obtenu après injection de l'extrait. La colonne utilisée ici était une vision HT C18 HL (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) et les deux solutions d'élution étaient, l'acétonitrile et le mélange eau/acide acétique à 0,3%. Les gradients d'élutions des deux extraits sont consignés dans le tableau II :

Tableau II : Gradients d'élution des extraits totaux de *N. velutina* en CLHP

Extrait aqueux		Extrait éthanolique	
Intervalle de temps (min)	Acétonitrile (%)	Intervalle de temps (min)	Acétonitrile (%)
1-10	00	1-10	50
10-15	00	10-15	50
15-20	5	15-20	50
20-25	5	20-25	75
25-35	10	25-30	75
35-50	20	30-45	100
50-60	100		

II-4- EVALUATION DE LA CAPACITE ANTIOXYDANTE *IN VITRO* DES EXTRAITS DE *NEOBOUTONIA VELUTINA*

II-4-1- Evaluation du pouvoir antioxydant total (TAC)

Différentes concentrations (10-2250 µg/ml) des extraits de *N. velutina* ont été préparées. A 0,1 mL de chaque solution préparée, était ajouté 1mL de réactif de travail constitué d'acide sulfurique (0,6 M) ; du phosphate de soude (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le mélange était incubé à 95°C pendant 90 minutes, puis laissé pour refroidissement à température ambiante. L'absorbance était lue à 695 nm contre le blanc. La silymarine et la vitamine C étaient utilisées comme références aux mêmes concentrations. L'augmentation de la densité optique était proportionnelle au pouvoir antioxydant total des extraits [180] ; [181].

II-4-2- Dosage des polyphénols totaux : test de Folin-Ciocalteu

Les polyphénols totaux ont été évalués grâce au réactif de Folin-ciocalteu. A 5 mL d'une solution de chacun des extraits de *N. velutina* (100 µg/mL) était ajouté 5 mL du réactif de Folin-ciocalteu dilué dans de l'eau (1:9 v/v). Cinq minutes après, 4 mL d'une solution de Na₂CO₃ à 7% étaient rajoutés. Le mélange était vortexé pendant 5 secondes puis incubé pendant 30 min à 40°C. L'absorbance était lue à 765 nm. L'acide gallique était utilisé comme standard et la quantité de polyphénols était exprimée en µg/g d'équivalent d'acide gallique [182].

II-4-3- Evaluation du pouvoir réducteur du fer : test de FRAP

Principe

Le pouvoir réducteur du fer des extraits de *N. velutina* a été évalué grâce à la méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Cette méthode mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le fer à pH faible. Au contact d'un antioxydant au pouvoir réducteur de fer, le complexe tripyridyltriazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) est réduit en complexe tripyridyltriazine ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) de couleur bleu intense absorbant à 593 nm [183].

Réactifs

Le réactif de FRAP était préparé en mélangeant 25 mL de tampon acétate 300 mM (pH 3,6) avec 2,5 mL de TPTZ 10 mM (2,4,6-tris (2-pyridyl)-S-triazine) dans le HCl (400 mM) et 2,5 mL de chlorure ferrique (10 mM).

Le tampon acétate 300 mM (pH 3,6) était obtenu en mélangeant 3,1 g d'acétate de sodium et 16 mL d'acide acétique par litre de tampon. La solution de TPTZ 10mM (2,4,6-tris (2-pyridyl)-S-triazine) était obtenue en dissolvant 0,156g de TPTZ dans 50 mL de HCl (400 mM). La solution de chlorure ferrique était quant à elle obtenue en dissolvant 0,081 g de chlorure de fer anhydride dans 50 mL d'eau distillée.

Mode opératoire

A 75 μL de chaque extrait à différentes concentrations (25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a été rajouté 2 mL de réactif de FRAP et l'absorbance a été lue à 593 nm après 12 minutes d'incubation à température ambiante. L'augmentation de la densité optique était proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits.

II-4-4- Evaluation du pouvoir anti-radicalaire au DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Principe

Le pouvoir antiradicalaire des extraits de *N. velutina* a été déterminé à l'aide du radical stable DPPH suivant la méthode décrite en 2001 par Aquino et al. [184], avec quelques modifications. A une longueur d'onde de 515 nm, le DPPH présente une bande absorbante qui, après réduction par un composé antiradicalaire, disparaît.

Mode opératoire

Dans une première expérimentation, à 50 µL d'une solution de chaque extrait à différentes concentrations (25-2250 µg/mL), il a été ajouté 100 µL d'une solution méthanolique de DPPH à 50 µg/mL, fraîchement préparée. L'absorbance a été lue à 515 nm après 30 minutes d'incubation à température ambiante à l'obscurité. Le BHT (butylated hydroxy toluene) et la vitamine C ont été utilisés comme références.

Dans une expérimentation différente, visant à mieux visualiser l'effet de l'extrait aqueux, une cinétique d'inhibition du DPPH a été réalisée. Ainsi, à 50 µL d'une solution d'extrait aqueux à différentes concentrations (25-2250 µg/mL), étaient ajoutés 100 µL d'une solution éthanolique de DPPH à 50 µg/mL fraîchement préparée. L'absorbance était lue à 515 nm toutes les 5 min pendant 120 minutes. La silymarine et la vitamine C ont été utilisées comme références. Les différentes expérimentations ont été faites en triplicate. Les concentrations du DPPH restant étaient déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage du DPPH, réalisée comme l'indique le Tableau III. Les IC₅₀ (concentrations inhibitrices 50) ont été calculés grâce au logiciel Graphpad Prism 5 et le pourcentage d'inhibition de DPPH calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{Abs DPPHo} - \text{Abs extrait})}{(\text{Abs DPPHo})} * 100$$

Où : Abs DPPHo= absorbance DPPH à 50 µg/mL

Abs extrait= absorbance extrait + DPPH

Tableau III : Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage du DPPH

N° de tube	DPPH (mL)	Méthanol (MeOH) (mL)	DPPH (µg/mL)
1	/	10	500
2	1 mL du tube 1	9	50
3	5 mL du tube 2	5	25
4	4 mL du tube 3	6	10
5	5 mL du tube 4	5	5
6	5 mL du tube 5	5	2,5
7	4 mL du tube 6	6	1

L'absorbance des solutions obtenues est lue à 515nm contre un blanc (MeOH ou ETOH) et la courbe d'étalonnage est tracée.

II-5- DOSAGE DES MINÉRAUX, FRACTIONNEMENT ET ISOLEMENT DE QUELQUES COMPOSÉS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE *N. VELUTINA*

II-5-1- Dosage des minéraux de l'extrait aqueux de *N. velutina*

Dans le but de dresser le profil minéral de l'extrait aqueux de *N. velutina*, un dosage de quelques macroéléments (Ca, Mg, K et Na) et micronutriments (Cu, Mn, Fe et Zn) a été réalisé suivant la méthode de Benton et Vernon (1990) [185]. Quelques minéraux ont été mis en évidence dans l'extrait aqueux de *N. velutina* après dessiccation de 500mg d'extrait dans un four à moufle à 500°C. L'échantillon séché a été dilué dans 5mL d'une solution acide de HNO₃/H₂O₂ (1:1) puis analysé dans un spectrophotomètre d'absorption atomique. Pour ce faire, 25 mL de solution standard à différentes concentrations (20, 10, 5, 2 et 1 mg/L) ont été préparés à partir d'une solution stock à 1000 mg/L. Le solvant de dilution des standards était la solution acide de HNO₃/H₂O₂ (1:1). Lors de l'analyse, le blanc (HNO₃/H₂O₂) était mesuré en premier, suivi des différentes concentrations standard en commençant par la solution à 1 mg/L et enfin la solution d'extrait.

II-5-2- Fractionnement de l'extrait aqueux de *N. velutina* -révélation et mise en évidence des fractions anti-radicalaires- isolement de quelques composés.

II-5-2-1- Fractionnement de l'extrait aqueux de *N. velutina*- révélation et mise en évidence des fractions anti-radicalaires.

Principe

L'extrait aqueux de *N. velutina* a été fractionné par chromatographie sur colonne. Le principe de base reste identique à celui d'une chromatographie sur couche mince, avec une phase stationnaire fixe et une phase mobile ou éluant. La phase stationnaire utilisée était le séphadex LH-20 et la phase mobile, une alternance d'eau et/ou méthanol.

Mode opératoire

Dans une colonne de chromatographie, il a été versé une solution de séphadex prête à l'emploi. Après avoir été abondamment rincé à l'eau (environ 2L), le séphadex a été laissé pendant une nuit pour le tassement. Une fois le séphadex bien tassé, une solution d'extrait (20 mL) à la concentration de 200 mg/mL y a été délicatement déposée et laissée quelques minutes pour imprégnation. L'extrait a

ensuite été élué avec un mélange d'eau osmosée et de méthanol suivant différents gradients décroissants de l'eau (100:0, 70:30, 50:50, 30:70, 0:100 v/v). Soit 1L de mélange de solvant par gradient. Deux cent cinquante millilitres de solvant ont été recueillis à chaque fois au robinet puis évaporés grâce à un évaporateur rotatif. Dans un souci de maîtrise de la concentration des fractions, celles-ci étaient reprises dans des tubes préalablement tarés et dans 5 mL d'eau osmosée ou de méthanol en fonction du degré de solubilité de la fraction dans l'un ou l'autre solvant. Les fractions reprises étaient à nouveau évaporées dans un speedvac puis pesées.

Dans le but de déterminer les fractions d'intérêts, toutes les fractions ont été déposées sur des plaques de CCM et ont ensuite été éluées puis observées sous UV à 254 et 366 nm. Les fractions dans lesquelles étaient observés des composés, étaient révélées au moyen de révélateurs chimiques (DPPH, DMACA, NEU, anisaldéhyde sulfurique...), puis analysées par CLHP. Ce procédé a permis d'obtenir 20 fractions numérotées F1 à F20 (Figure 6).

Les fractions de F2 à F6 ont présenté une activité anti-radicalaire au DPPH. Dans le but d'avoir une plus grande concentration du composé anti-radicalaire éventuellement présent dans ces fractions, leur rassemblement avait été envisagé mais au regard des différences dans leur profil CLHP, cette possibilité a été abandonnée. Au final, en tenant compte de son degré de pureté en CLHP, de son activité antiradicalaire et de sa masse (162,7 ; 57 ; 14 et 7,5mg pour F2, F3, F4 et F5 respectivement), une attention particulière a été portée à la fraction F3 qui a été sous-fractionnée (Figure 6).

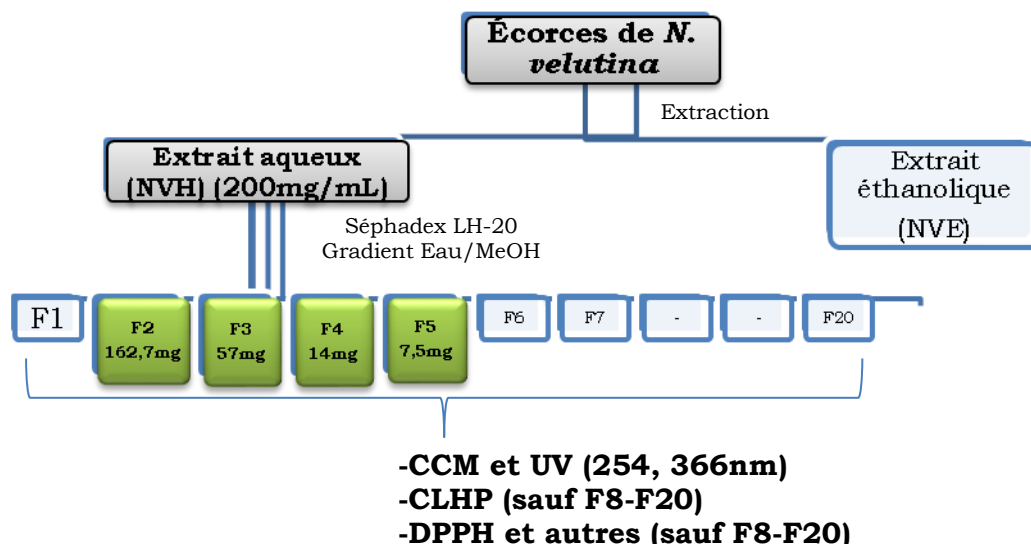


Figure 6 : Schéma du fractionnement de l'extrait aqueux de *N. velutina*

II-5-2-2- Sous- fractionnement de la fraction F3 de l'extrait aqueux de *N. velutina*

Principe et description du dispositif

La fraction F3 de l'extrait aqueux de *N. velutina* a été sous-fractionnée par chromatographie liquide sous moyenne pression (CLMP). De même que la chromatographie sur colonne, la CCM et la CLHP, la CLMP respecte le principe de base de la chromatographie en reprenant, en plus simple, toute l'organisation d'une chaîne CLHP. Son système comporte ainsi un injecteur, servant à introduire l'échantillon dans le système et une colonne dans laquelle passe la phase mobile dont la progression est assurée par une ou plusieurs pompes. La particularité de la CLMP réside dans la possibilité de travailler à moyenne pression (50 bars maximum) en gardant une résolution assez bonne avec des résultats en général très satisfaisants.

Mode opératoire

La fraction F3 concentrée à 50 mg/mL a été injectée dans un système Büchi comportant une pompe C-605 et un contrôleur de pression C-615. Le solvant d'éluion était un mélange d'eau osmosée et de méthanol suivant différents gradients décroissants de l'eau (10:0 ; 9,5:0,5 ; 9:1 ; 8,5:1,5 ; 8:2 ; 0:10 v/v). Dans

des tubes préalablement tarés, 10 mL du solvant étaient recueillis à chaque fois au bout du système. Au final, 53 sous-fractions de F3 ont été obtenues par ce procédé et numérotées F3_1 jusqu'à F3_53. Toutes les sous-fractions ont ensuite été évaporées dans un speedvac, pesées puis reprises dans 1mL d'eau osmosée ou de méthanol en fonction de la solubilité de la sous-fraction.

Les sous-fractions reprises étaient ensuite déposées sur des plaques de CCM, ensuite éluées puis observées sous UV à 254 et 366 nm. Les sous-fractions présentant des composés étaient ensuite révélées au moyen des révélateurs chimiques précédemment évoqués (DPPH, DMACA, NEU, Anisaldéhyde sulfurique...). Toutes les sous-fractions qui présentaient un intérêt étaient analysées en CLHP et celles qui apparaissaient plus ou moins pures (un seul pic sur le chronogramme en CLHP) étaient retenues pour une analyse en RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et LC-MS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry).

II-5-2-3- Isolement des composés et mise en évidence du composé anti-radicalaire

Des 53 sous-fractions, 10 sous-fractions ont été retenues comme étant plus ou moins pures, ce sont les sous-fractions F3_9 ; F3_10 ; F3_12 ; F3_13 ; F3_17 ; F3_18 ; F3_38 ; F3_41 ; F3_52 et F3_53. Au regard de leurs profils CCM et CLHP identiques, ces sous-fractions ont été rassemblées deux par deux soit F3_9 et F3_10 ; F3_12 et F3_13 ; F3_17 et F3_18 ; F3_38 et F3_41 puis F3_52 et F3_53. Ce qui a conduit au final à 5 sous-fractions dont F3_910, F3_1213, F3_1718, F3_3841 et F3_5253. Toutes ces sous-fractions ont été analysées et la sous-fraction F3_5253 a été la seule positive au test anti-radicalaire au DPPH (Figure 7). Dans le but d'identifier les composés présents dans nos 5 sous-fractions rassemblées, leurs analyses RMN et LC-MS ont été faites.

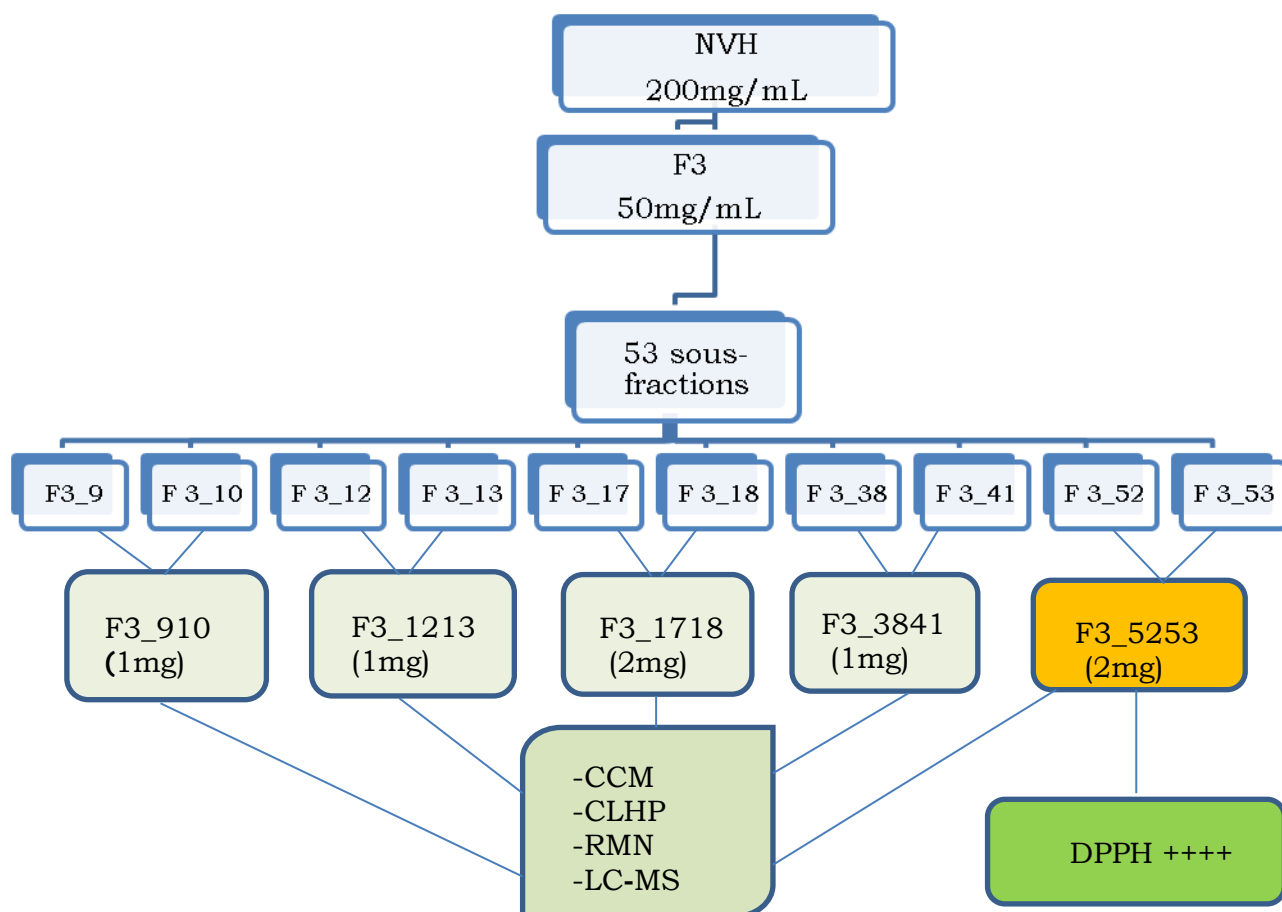


Figure 7 : Schéma du sous-fractionnement de la fraction F3 de l'extrait aqueux de *N. velutina*.

II-6- PROFIL TOXICOLOGIQUE DES EXTRAITS DE *N. VELUTINA*

II-6-1- ETUDE DE LA CYTOTOXICITE DES EXTRAITS

III-6-1-1- Dosage de la Lactate déshydrogénase

Principe

La Lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique présente dans toutes les cellules. Elle est rapidement libérée dans le surnageant des cellules en culture ou dans le milieu extracellulaire lorsque la membrane de la cellule est rompue. L'apparition de la LDH dans le milieu extracellulaire ou le surnageant cellulaire est un bon marqueur de la lyse cellulaire car la quantité libérée est proportionnelle au nombre de cellules lysées. Ainsi, grâce au dosage de son activité enzymatique il est possible de déterminer la cytotoxicité d'un produit.

Cette méthode est basée sur la conversion de L-lactate en pyruvate par l'oxydation et la réduction simultanée du NAD⁺ en NADH. L'apparition du NADH dans le milieu entraîne une réaction enzymatique par la LDH et la conversion du sel de tetrazolium en formazan (produit rouge). L'intensité de la réaction enzymatique dans le milieu est proportionnelle au nombre des cellules lysées [186] .

Expérimentation

L'activité de la LDH a été évaluée grâce au kit « cytotoxicity Detection Kit (LDH) » de Roche Applied Science, version Juillet 2005, qui est un test colorimétrique. Les cellules HepG2 ont été mises en puits dans les plaques de 6 puits à raison de 200 000 cellules/puits. Quarante et huit heures après la mise en puits, elles ont été traitées à différentes concentrations d'extrait (1, 10, 100 µg/mL), puis incubées pendant différents temps (2, 6 et 24 h). Après incubation, les surnageants ont été récupérés puis centrifugés. Cent microlitres de surnageant étaient ensuite déposés dans des puits sur une plaque de 96 puits. Le milieu de culture et le triton 1% étaient utilisés comme contrôle. La réaction enzymatique démarrait après l'ajout de 100 µl du mélange réactionnel et se déroulait à l'obscurité pendant 30 min à 20°C. L'activité de la LDH était révélée par la lecture de l'absorbance à 490 nm et le pourcentage de cytotoxicité était calculé suivant la formule :

$$\% \text{ cytotoxicité} = (\text{échantillon} - \text{contrôle faible}) / (\text{contrôle fort} - \text{contrôle faible})$$

Où : **Contrôle faible**= absorbance du surnageant (cellules + milieu de culture)

Contrôle fort= absorbance du surnageant (cellules + milieu de culture + triton 1%)

Echantillon= absorbance du surnageant (cellules + milieu de culture + extrait)

II-6-1-2- Effets des extraits sur la viabilité cellulaire : Test au MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium)

Principe

Le test au MTT est largement utilisé pour les études de la viabilité cellulaire et consiste en la réduction du MTT par les cellules métaboliquement actives. Cette réduction est en partie due à l'action de la déshydrogénase pour générer les réducteurs comme le NADH et le NADPH. Le formazan intracellulaire violet résultant de la réduction du MTT peut être solubilisé et quantifié par spectroscopie [187], [188].

Expérimentation

L'effet des extraits sur la viabilité cellulaire a été évalué grâce au kit « TACS® MTT Cell Proliferation Assays » de Trevigen, conformément aux instructions du fabricant.

Les cellules HepG2 ont été mises en puits dans des plaques de 96 puits, à raison de 25 000 cellules /puits /100 µL de milieu de culture. Elles ont ensuite été incubées pendant 24 h. Au bout des 24 h, les cellules ont été traitées à différentes concentrations des extraits (1, 10 et 100 µg/mL), puis incubées pendant 24h. Dix microlitres du réactif de MTT ont ensuite été ajoutés par puits et les plaques ont été incubées pendant 2 heures jusqu'à l'apparition intracellulaire de la couleur violette du formazan, observable sous microscope. Une fois la couleur violette apparue, 100 µL de détergent ont été ajoutés par puits et les plaques ont à nouveau été incubées pendant 2 heures. Ces plaques ont ensuite été lues dans un lecteur de microplaque à une longueur d'onde de 570 nm. La silymarine a été utilisée ici comme substance de référence.

Dans le but de mieux comprendre l'effet des extraits sur la viabilité cellulaire, une cinétique a été dressée sur des cellules synchronisées. Ainsi, les cellules HepG2 ont été mises en puits dans des plaques de 96 puits, à raison de 25 000 cellules/puits, puis incubées pendant 24h pour leur permettre d'adhérer à la plaque. Vingt et quatre heures plus tard, elles étaient synchronisées pendant 12 heures avec du milieu de culture sans sérum de veau fœtal. Après synchronisation, les cellules étaient traitées à différentes concentrations des extraits (0,01, 0,1, 1, 10, 100 µg/mL), puis incubées pendant différents temps (3h, 6h et 24h). Au terme de chaque temps d'incubation, comme précédemment, 10 µL du réactif de MTT étaient ajoutés par puits et les plaques étaient incubées pendant 2 heures jusqu'à l'apparition intracellulaire de la couleur violette du formazan. Une fois la couleur violette apparue, 100 µL de détergent étaient ajoutés et les plaques étaient incubées pendant 2 heures, puis lues dans un lecteur de microplaque à une longueur d'onde de 570 nm. La doxorubicine qui est un anticancéreux a été utilisée comme substance de référence.

Plusieurs expérimentations indépendantes ont été faites en triplicate.

Les pourcentages de viabilité ont été calculés comme suit :

$$\% \text{ de viabilité} = [(\text{Abs échantillon} - \text{Abs contrôle}) / \text{Abs contrôle}] * 100$$

Où **Abs échantillon**= Absorbance des puits essais (cellules + milieu de culture + extrait), à laquelle il a été soustrait l'absorbance du blanc (milieu de culture seul sans cellules)

Abs contrôle= Absorbance des puits contrôle (cellules + milieu de culture), à laquelle il a été soustrait l'absorbance du blanc (milieu de culture seul sans cellules)

II-6-1-3- Effets des extraits sur l'apoptose cellulaire : Test de TUNEL

Principe

Le clivage de l'ADN génomique au cours de l'apoptose peut conduire à 2 fragments d'ADN de poids moléculaire faible ou à un fragment d'ADN de poids moléculaire élevé. Ces fragments d'ADN peuvent être identifiés en marquant dans une réaction enzymatique, le 3'-OH terminé avec des nucléotides modifiés. Le test de TUNEL est connu pour sa précision, sa rapidité et sa technique non radioactive simple, dans la détection et la quantification des cellules apoptotiques [189].

Expérimentation

L'effet des extraits sur l'apoptose cellulaire a été évalué grâce au kit « *In Situ* Cell Death Detection Kit, fluorescein » de Roche Applied Science, version Novembre 2004, conformément aux instructions du fabricant. Les cellules HepG2 ont été mises en puits à raison de 200 000 cellules/puits, dans des plaques de 6 puits contenant des lamelles au fond. Elles ont ensuite été incubées pendant 24h pour leur permettre d'adhérer aux lamelles, puis traitées à différentes concentrations de l'extrait (1, 10, 100 µg/mL). Vingt et quatre heures après le traitement, les milieux de culture étaient aspirés et les cellules étaient rincées au PBS puis fixées dans du paraformaldéhyde 4% (PFA) pendant 1h à 25°C. Les cellules fixées étaient ensuite rincées avec du PBS puis incubées dans la solution de perméabilisation (0,1% de triton X-100 dans 0,1% de citrate de sodium) pendant 2 min dans de la glace (2-8°C). Après perméabilisation, les lamelles étaient récupérées, rincées deux fois dans du PBS puis incubées avec 50 µL de réactif de TUNEL par lamelle pendant 1h à 37°C dans le noir et une atmosphère humide. Les lamelles après incubation étaient de nouveau rincées trois fois dans du PBS puis montées sur une lame, prêtes à être observées au microscope sous fluorescence. Les cellules apoptotiques apparaissent en rouge sous fluorescence.

II-6-2- TOXICITE AIGUË *IN VIVO* DES EXTRAITS DE *N. VELUTINA*

Répartition des animaux

La toxicité aiguë de nos extraits a été évaluée selon Delongas, 1983 [190] et l'OCDE, 2001 avec quelques modifications [191]. Les animaux ont été répartis en 7 groupes de 10 animaux (5 mâles et 5 femelles) chacun comme suit :

- Groupe 1, contrôle recevant de l'eau distillée à 5 mL/kg;
- Groupe 2, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à la dose de 1000 mg/kg,
- Groupe 3, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à la dose de 2000 mg/kg;
- Groupe 4, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à la dose de 5000 mg/kg;
- Groupe 5, contrôle recevant l'éthanol 95° à 5 mL/kg;
- Groupe 6, essai recevant l'extrait éthanolique de *N. velutina* à la dose de 500 mg/kg;
- Groupe 7, essai recevant l'extrait éthanolique de *N. velutina* à la dose de 1000 mg/kg.

Expérimentation

Les extraits aqueux et éthanolique de *N. velutina* ont été dissouts dans de l'eau et l'éthanol, respectivement. Ils ont ensuite été administrés aux animaux par gavage et en dose unique après 12 h de jeûne. Après administration des extraits, dans le but d'évaluer d'éventuels signes extérieurs de toxicité (diarrhée, fatigue, signe de douleur, difficulté à se déplacer) les animaux ont été observés durant les deux heures qui suivaient l'administration des extraits. Le poids corporel a été noté le jour de l'administration (j0), 24h (j1) et 7 jours (j7) après administration des extraits. Les mortalités ont de même été notées. Les animaux survivants au 7^{ème} jour ont été sacrifiés. Le foie, les reins, la rate, le poumon, le cœur ont été prélevés puis pesés.

II-7- ETUDE *IN VITRO* DE L'EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE HEPATIQUE DES EXTRAITS DE *N. VELUTINA*

II-7-1- Effets des extraits en post-traitement des cellules HepG2 stimulées

Design des expérimentations

Pour chacun des extraits, l'expérimentation a été faite en triplicate et les cellules étaient réparties en 8 groupes : Un groupe contrôle ayant reçu le milieu de culture seul, un autre groupe contrôle ayant reçu le TNF α /IFN γ comme agent

stimulant de l'inflammation, 3 groupes essais ayant reçu différentes concentrations d'extrait (1, 10, 100 µg/mL) et 3 autres groupes essais ayant reçu différentes concentrations d'extraits (1, 10, 100 µg/mL) en plus de l'agent stimulant (TNF α /IFN γ).

Méthodologie

Les cellules hepG2 (200 000 cellules/puits) ont été mises en puits dans les plaques de 6 puits. Pour adhérer à la plaque, elles ont été laissées au repos dans l'incubateur (37 °C, 5 % de CO $_2$) pendant une nuit. Après adhérence des cellules, une moitié des puits a été stimulée (1,5 mL/puits) avec du TNF α (50 ng/mL) et l'IFN γ (100 ng/mL) dilués dans le milieu de culture. L'autre moitié n'a reçu que du milieu de culture (1.5 mL) sans TNF α ni IFN γ . Vingt et quatre heures après stimulation des cellules, les différents groupes essais ont été traités (1,5 mL/puits) aux différents extraits de plante, à différentes concentrations (1, 10 et 100 µg/mL). Les groupes contrôles n'ont reçu que le milieu de culture.

Après traitement à l'extrait, les cellules ont été incubées pendant différents temps (2, 6 et 24h). Après chaque temps d'incubation, les surnageants étaient récupérés et conservés à -20°C pour le dosage de la LDH. Les cellules étaient traitées au tampon de lyse cellulaire (200 µL) puis conservées à -80°C pour l'extraction de l'ARNm. Les différentes concentrations d'extrait (1, 10 et 100 µg/mL) étaient obtenues à partir d'une solution mère d'extrait après dilution dans du milieu de culture.

II-7-2- Effets des extraits en co-traitement des cellules HepaRG et/ou HepG2 stimulées

Design des expérimentations

Comme précédemment, les différentes expérimentations étaient faites en triplicate et les cellules étaient réparties en 12 groupes: Un groupe contrôle ayant reçu le milieu de culture seul, un autre groupe contrôle ayant reçu le TNF α /IFN γ comme agent stimulant de l'inflammation, un groupe essai ayant reçu la dexaméthasone (10 $^{-6}$ M) ou la silymarine (10 µg/mL), un groupe essai ayant reçu la dexaméthasone (10 $^{-6}$ M) ou la silymarine (10 µg/mL) en co-traitement avec l'agent stimulant (TNF α /IFN γ), 4 groupes essais ayant reçu différentes concentrations d'extrait (1 ng/mL -100 µg/mL) et 4 autres groupes essais ayant reçu différentes

concentrations d'extraits (1 ng/mL -100 µg/mL) en co-traitement avec l'agent stimulant (TNF α /IFN γ).

Méthodologie

Les cellules HepG2 ou hepaRG différenciées en hépatocytes ont été mises en puits dans des plaques de 6 puits, à raison de 200 000 cellules/puits. Elles ont de même été laissées au repos pendant la nuit pour permettre leur adhésion à la plaque. Une fois les cellules adhérentes, la moitié des puits a été stimulée avec du TNF α (50 ng/mL) et l'IFN γ (100 ng/mL). Immédiatement après stimulation, en fonction des groupes, les différents puits essais ont été traités au dexaméthasone (10⁻⁶ M), à la silymarine (10 µg/mL) ou aux extraits préalablement dilués dans le milieu de culture aux concentrations souhaitées (1, 10, 100 ng/mL et 1 µg/mL pour l'expérimentation faite sur les hepaRG ou 1, 10, 50 et 100 µg/mL pour l'expérimentation faite sur les HepG2). L'autre moitié des puits recevait en fonction du groupe, le milieu de culture seul (groupes contrôles), la dexaméthasone seule (10⁻⁶ M), la silymarine seule (10 µg/mL) ou différentes concentrations d'extraits. La dexaméthasone (10⁻⁶ M) ou la silymarine (10 µg/mL) étaient diluées dans le milieu de culture et utilisées comme produit de référence. Chaque puits recevait un volume total de 1,5 mL.

Après traitement, toutes les plaques étaient incubées pendant 24h. Au terme des 24h, les surnageants étaient récupérés et conservés à -20°C pour le dosage de la LDH. Les cellules étaient traitées au tampon de lyse cellulaire (200 µL) puis conservées à -80°C pour l'extraction de l'ARNm.

II-8- ETUDES *IN VIVO* DE L'EFFET DES EXTRAITS DE *N. VELUTINA* EN TRAITEMENT CURATIF DE L'HEPATITE AIGUË INDUITE PAR LE TETRACHLORURE DE CARBONE

II-8-1- Effets de l'extrait aqueux de *N. velutina*

II-8-1-1 Effets en traitement curatif après 24h chez la souris C57BL/6

Répartition des animaux

Les animaux ont été répartis en 6 groupes de 10 animaux chacun comme suit :

- Groupe 1, contrôle recevant l'huile d'olive (véhicule du CCl₄) et l'eau distillée (véhicule de l'extrait aqueux) ;
- Groupe 2, contrôle recevant du CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive ;

-
- Groupe 3, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à 150 mg/kg ;
 - Groupe 4, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à 75 mg/kg ;
 - Groupe 5, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* (150 mg/kg) +CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive ;
 - Groupe 6, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* (75 mg/kg) +CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive.

Induction de l'hépatite aiguë au CCl₄, traitement à l'extrait et sacrifice des animaux.

La durée de cette étude était de 24h. Au jour 0, l'hépatite aiguë a été induite par injection intrapéritonéale de CCl₄ à la dose de 100 µL/kg, chez les animaux des groupes 2, 5 et 6. Le traitement à l'extrait aux doses de 75 et 150 mg/kg et par gavage, a suivi immédiatement après injection de CCl₄ chez les animaux des groupes 5 et 6. Les animaux des groupes 3 et 4 ont reçu de l'huile d'olive en injection intrapéritonéale et l'extrait aqueux en gavage. Les animaux contrôles du groupe 1 ont reçu de l'huile d'olive en injection intrapéritonéale et l'eau distillée en gavage. Au jour 1, soit 24h après injection du CCl₄ et traitement à l'extrait, tous les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Pour le dosage des transaminases, avant la dislocation cervicale, le sang a été recueilli par ponction rétro-orbitale chez l'animal sous anesthésie à l'isoflurane. Pour l'analyse histologique, une partie du foie a été conservé à 4°C, dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant une nuit. Une autre partie du foie a été conservée à -80°C pour l'extraction des ARNm.

II-8-1-2- Effets en traitement curatif après 48h chez la souris BALB/C

Répartition des animaux

Les animaux ont été répartis en 6 groupes de 6 animaux chacun comme suit :

- Groupe 1, contrôle recevant l'huile d'olive (véhicule du CCl₄) et l'eau distillée (véhicule de l'extrait aqueux) ;
- Groupe 2, contrôle recevant du CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive ;
- Groupe 3, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à 75 mg/kg ;
- Groupe 4, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* (75 mg/kg) + le CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive ;

-
- Groupe 5, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* (37,5 mg/kg) +CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive ;
 - Groupe 6, essai recevant la silymarine (50 mg/kg) + le CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive.

Induction de l'hépatite aiguë au CCl₄, traitement à l'extrait et sacrifice des animaux.

Cette étude a été menée en 48h. De même que sur les souris C57BL/6, au jour 0, l'hépatite aiguë a été induite par injection intrapéritonéale de CCl₄ à la dose de 100 µL/kg, chez les animaux des groupes 2, 4, 5 et 6. Le traitement à l'extrait aux doses de 75 et 37,5 mg/kg et par gavage, a suivi immédiatement après injection de CCl₄ chez les animaux des groupes 4 et 5. Les animaux du groupe 6 ont reçu la silymarine (50 mg/kg) en gavage immédiatement après injection de CCl₄ tandis que ceux du groupe 3 ont reçu de l'huile d'olive en injection intrapéritonéale et l'extrait en gavage. Les animaux du groupe 1 ont reçu de l'huile d'olive en injection intrapéritonéale et l'eau distillée en gavage. Au jour 1, les traitements à l'extrait et à la silymarine ont été renouvelés et le sang a été prélevé par ponction rétro-orbitale chez l'animal sous anesthésie à l'isoflurane, pour le dosage des transaminases. Au jour 2, tous les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Pour l'analyse histologique, une partie du foie a été conservée dans du formol tamponné à 10%. Une autre partie a été conservée à -20°C pour la préparation des homogénats tissulaires.

II-8-2- Effets de l'extrait à l'éthanol de *N. velutina*

II-8-2-1- Effets en traitement curatif après 48h chez la souris C57BL/6

Répartition des animaux

Les animaux ont été répartis en 5 groupes de 10 animaux chacun comme suit :

- Groupe 1, contrôle recevant l'huile d'olive (véhicule du CCl₄) et la carboxyméthylcellulose à 0,5% +l'éthanol 95° (véhicule de l'extrait éthanolique) ;
- Groupe 2, contrôle recevant du CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive ;
- Groupe 3, essai recevant l'extrait éthanolique (150 mg/kg) dissout dans la carboxyméthylcellulose à 0,5% +l'éthanol 100° ;

-
- Groupe 4, essai recevant l'extrait éthanolique (150 mg/kg) dissout dans la carboxyméthylcellulose à 0,5% +l'éthanol 100° + du CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive ;
 - Groupe 5, essai recevant l'extrait éthanolique (75 mg/kg) dissout dans la carboxyméthylcellulose à 0,5% +l'éthanol 100° + du CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive ;
 - Groupe 6, essai recevant la silymarine (50 mg/kg) dissoute dans la carboxyméthylcellulose à 0,5% +l'éthanol 100° + du CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive.

Induction de l'hépatite aiguë au CCl₄, traitement à l'extrait et sacrifice des animaux.

Cette étude a été menée en 48h. L'hépatite aiguë a été induite au jour 0, par injection intrapéritonéale de CCl₄ à la dose de 100 µL/kg, chez les animaux des groupes 2, 4, 5 et 6. Le traitement à l'extrait aux doses de 75 et 150 mg/kg et par gavage, a suivi immédiatement après injection de CCl₄ chez les animaux des groupes 4 et 5. Les animaux du groupe 6 ont reçu la silymarine (50 mg/kg) en gavage immédiatement après injection de CCl₄ tandis que ceux du groupe 3 ont reçu de l'huile d'olive en injection intrapéritonéale et l'extrait en gavage. Les animaux contrôles du groupe 1 ont reçu de l'huile d'olive en injection intrapéritonéale et le véhicule en gavage. Au jour 1, les traitements à l'extrait et à la silymarine ont été renouvelés. Au jour 2, tous les animaux survivants ont été sacrifiés par dislocation cervicale. De même pour le dosage des transaminases, le sang a été recueilli par ponction rétro-orbitale chez l'animal sous anesthésie à l'isoflurane. Une partie du foie a été conservé à 4°C, dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant une nuit. Une autre partie a été conservée à -80°C pour l'extraction des ARNm.

Une très forte mortalité des animaux a été notée dans les groupes traités à l'extrait à l'éthanol de *N. velutina* lors de cette étude (100% de mortalité dans le groupe traité à 150 mg/kg). Ceci a conduit à poursuivre le travail uniquement avec l'extrait aqueux de *N. velutina*.

II-9- EVALUATION DES EFFETS DE L'EXTRAIT AQUEUX EN TRAITEMENT PREVENTIF

II-9-1- Evaluation des effets de l'extrait aqueux sur l'hépatite aiguë induite par le CCl₄ chez la souris C57BL/6

Répartition des animaux

Les animaux ont été répartis en 10 groupes de 10 animaux chacun comme suit :

- Groupe 1, contrôle recevant l'huile d'olive et l'eau de robinet ;
- Groupe 2, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à 3 mg/kg ;
- Groupe 3, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à 15 mg/kg ;
- Groupe 4, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à 75 mg/kg ;
- Groupe 5, essai recevant la méthylprednisolone à 50 mg/kg ;
- Groupe 6, contrôle recevant du CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive ;
- Groupe 7, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à 3 mg/kg + le CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive ;
- Groupe 8, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à 15 mg/kg + le CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive ;
- Groupe 9, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à 75 mg/kg + le CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive ;
- Groupe 10, essai recevant la méthylprednisolone à 50 mg/kg + le CCl₄ (100 µL/kg) dans de l'huile d'olive.

Induction de l'hépatite aiguë au CCl₄, traitement à l'extrait et sacrifice des animaux.

L'expérimentation s'est faite sur 4 jours. A j-2 et j-1, les animaux des groupes 2, 3, 4, 7, 8 et 9 ont reçu en dose unique et par gavage, l'extrait aqueux aux différentes doses (3, 15, 75 mg/kg). Ceux des groupes 5 et 10 ont reçu la méthylprednisolone (50 mg/kg) en dose unique et par injection intrapéritonéale. Les animaux du groupe 1 et ceux du groupe 6 ont quant à eux reçu de l'eau de robinet en gavage. A j0, l'hépatite aiguë a été induite comme dans les expérimentations précédentes, par injection intrapéritonéale de CCl₄ à la dose de 100 µL/kg, chez les animaux des groupes 6, 7, 8, 9 et 10. Les animaux des groupes : 1, 2, 3, 4 et 5 ont pendant ce temps reçu de l'huile d'olive en injection intrapéritonéale. Après injection du CCl₄, les traitements à l'extrait et à la méthylprednisolone ont immédiatement été renouvelés dans les groupes comme à j-2 et j-1. A j1, tous les animaux ont été sacrifiés. Le sang a été prélevé par ponction rétro-orbitale chez

l'animal sous anesthésie à l'isoflurane, pour le dosage des transaminases. Une partie du foie a été conservé à 4°C, dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant une nuit pour les analyses histologique et immunohistochimique. Une autre partie a été conservée à -80°C pour l'extraction des ARN et une autre à -80°C pour la préparation des homogénats tissulaires.

II-9-2- Evaluation des effets de l'extrait aqueux sur l'hépatite aiguë induite par la Concanavalin A (ConA) chez la souris C57BL/6

Répartition des animaux

Les animaux ont été répartis en 5 groupes de 20 animaux chacun comme suit :

- Groupe 1, contrôle recevant le NaCl 9‰ et l'eau de robinet ;
- Groupe 2, contrôle recevant la ConA (10 mg/kg) dans le NaCl 9‰ ;
- Groupe 3, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à 15 mg/kg + la ConA (10 mg/kg) dans le NaCl 9‰ ;
- Groupe 4, essai recevant l'extrait aqueux de *N. velutina* à 75 mg/kg + la ConA (10 mg/kg) dans le NaCl 9‰ ;
- Groupe 5, essai recevant la méthylprednisolone à 50 mg/kg + la ConA (10mg/kg) dans le NaCl 9‰.

Induction de l'hépatite aiguë par la ConA, traitement à l'extrait et sacrifice des animaux.

L'expérimentation s'est faite sur 3jours. A j-2 et j-1, les animaux des groupes 3 et 4 ont reçu en dose unique et par gavage, l'extrait aqueux aux différentes doses (15 et 75 mg/kg). Ceux du groupe 5 ont reçu la méthylprednisolone (50mg/kg) en dose unique et par injection intrapéritonéale. Les animaux des groupes 1 et 2 ont quant à eux reçu de l'eau de robinet en gavage. A j0, l'hépatite aiguë a été induite par injection intrapéritonéale de ConA à la dose de 10 mg/kg, chez les animaux des groupes 2, 3, 4 et 5. Les animaux du groupe 1 ont pendant ce temps reçu du NaCl 9‰ en injection intrapéritonéale. Immédiatement après injection de la ConA, les traitements à l'extrait et à la méthylprednisolone ont été renouvelés dans les groupes comme à j-2 et j-1. Huit heures après l'injection de la ConA, tous les animaux ont été sacrifiés. Le sang a été prélevé par ponction rétro-orbitale chez l'animal sous anesthésie à l'isoflurane, pour le dosage des transaminases. Une partie du foie a été conservé à 4°C, dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant une nuit pour l'analyse histologique. Une autre partie a été conservée à -80°C pour

l'extraction des ARNm et une autre à -80°C pour la préparation des homogénats tissulaires.

II-10- PREPARATION DES HOMOGENATS DE FOIE- EXTRACTION DES ARNm, QUANTIFICATION ET TRANSCRIPTION INVERSE DES ARNm TOTAUX – QPCR

II-10-1- Préparation des homogénats 10%

Les échantillons de foie étaient prélevés lors du sacrifice des animaux, pour la réalisation des homogénats. Chaque morceau a été repris à une concentration de 100 mg/mL (10%) dans du PBS contenant du BHT 1X (pour prévenir l'oxydation des lipides durant le dosage de la MDA). Les échantillons d'organes ainsi repris ont été homogénéisés et maintenus dans un bac de glace durant le procédé d'homogénéisation, puis centrifugés pendant 5 min à 10 g et 4°C. Les surnageants ont été collectés puis conservés à -80°C pour les dosages ultérieurs.

II-10-2- Extraction, quantification, transcription inverse (RT) des ARN totaux et qPCR

Principe de l'extraction

Le principe consiste en la lyse des cellules par incubation des cellules ou du tissu, dans un tampon de lyse (RA1) contenant une large quantité d'ions chaotropiques. Ce tampon de lyse inactive immédiatement les RNase présents dans tout matériel biologique et crée des conditions appropriées de liaison, ce qui favorise l'absorption de l'ARN au niveau de la membrane de silice. L'ADN également lié à la membrane de silice est enlevé grâce à la solution de rDNase directement déposée sur la membrane. Les étapes de lavage avec différents tampons permettent d'éliminer les sels, les métabolites et les composés macromoléculaires de la cellule. L'ARN pur est finalement élué dans les conditions de faible force ionique avec de l'eau RNase free.

Méthodologie

L'extraction des ARN totaux s'est faite suivant le « protocole-à-un coup d'œil », à l'aide du kit d'extraction d'ARN totaux, « NucleoSpin RNA® II » (MACHEREY-NAGEL, Janvier 2010/Rev.11). La procédure d'extraction comportait 9 étapes :

1- la récupération des échantillons après les différentes expérimentations sur les cellules et chez les souris,

-
- 2- la lyse des cellules par ajout de 350 μL de RA1 et 3,5 μL de bêta-mercaptoéthanol (sur les cellules ou les fragments de foie) puis homogénéisation,
 - 3- la filtration du mélange à travers la colonne rose de filtration puis centrifugation à 11000 g pendant 1 minute à 4°C,
 - 4- la récupération du filtrat et l'ajout de 350 μL d'éthanol à 70% puis mélange par des aspirations et refoulements répétitifs,
 - 5- le passage du mélange à travers la membrane de silice (colonne bleue) puis centrifugation à 11000 g pendant 30 secondes,
 - 6- la récupération de la membrane de silice et le passage de 350 μL de la solution de MDB (« Membrane Desalting Buffer ») pour dessaler la membrane puis centrifugation à 11000 g pendant 1 minute,
 - 7- la récupération de la membrane de silice et le passage de 95 μL du mélange réactionnel de DNase puis incubation à température ambiante pendant 15 minutes,
 - 8- la récupération de la membrane de silice et le lavage puis séchage de la membrane de silice (1^{er} lavage avec 200 μL du tampon RA2 puis centrifugation à 11000 g pendant 30 secondes, 2^{ème} lavage avec 600 μL du tampon RA3 puis centrifugation à 11000 g pendant 30 secondes et 3^{ème} lavage avec 250 μL de RA3 puis centrifugation à 11000 g pendant 2 minutes),
 - 9- l'éluion de l'ARN pur par dépôt de 60 μL de l'eau RNase-free sur la membrane puis centrifugation à 11000 g pendant 1 minute.

Les ARN obtenus après extraction étaient quantifiés à l'aide du spectrophotomètre nanodrop 1000. Brièvement, 1,5 μL de la solution d'ARN était déposé sur le spectrophotomètre et la quantité d'ARN était mesurée. Les ARN quantifiés étaient ensuite dilués de façon à obtenir une concentration finale de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Après la quantification des ARN, suivait leur transcription inverse (RT) à l'aide du kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription kit » de Applied Biosystems (USA). Ainsi, à 10 μL d'ARN dilué, il était ajouté 10 μL du mélange réactionnel contenant le tampon RT (2X), le dNTP (8mM), le RT random primer (2X), l'enzyme multiscribe (5U/ μL) et l'eau RNase free (qsp 10 μL). Après homogénéisation et centrifugation, le mélange était incubé dans un thermocycler (Gene Amp® PCR

system 9700, « applied biosystems ») et les ADNc étaient obtenus au bout de 150 minutes puis dilués à 20%.

La qPCR (« quantitative polymerase chain reaction ») proprement dite consistait à déposer dans les plaques de PCR de 96 puits, 2,5 µL d'ADNc dilués et 9,5 µL de mix. Le mix était composé du « fast sybergreen de Applied Biosystems » (6 µL), de l'eau RNase free (3 µL) et de la paire d'amorces d'intérêt sens et antisens, préalablement diluée à 10% (0,25 µL). La plaque prête était fermée avec du film transparent et lue à l'aide du « StepOnePlus Real-time PCR system » de Applied Biosystems. Les quantités relatives d'ARNm obtenues étaient normalisées sur le GAPDH (Glycéraldéhyde 3 Phosphate Deshydrogénase).

II-11- ANALYSES HISTOLOGIQUE ET IMMUNOHISTOCHEMIE

II-11-1- Analyses histologiques

- Déshydrations, éclaircissement, inclusion des organes et montage des blocs

Afin d'obtenir des coupes histologiques, les organes préalablement conservés dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% ont été déshydratés par passages successifs dans 3 bains d'alcool à 95° pendant 30 minutes chacun, puis passages successifs dans 3 bains d'alcool à 100° pendant 30 minutes chacun. Ces organes ont ensuite été éclaircis par passages successifs dans 3 bains de xylène pendant 30 minutes (1^{er} bain), 1h (2^{ème} bain) et 1h30 (3^{ème} bain). Après éclaircissement, les organes ont été inclus dans de la paraffine par passages successifs dans 2 bains de paraffine, à raison de 1h dans chacun des bains. Après le 2^{ème} bain de paraffine les organes ont été montés en blocs de paraffine, prêts à être coupés.

- Coupes, coloration et montage des lames

Les coupes de foie d'une épaisseur de 4 microns ont été réalisées sur un microtome (Leica RM 2145) avec une inclinaison de 3. Elles ont ensuite été déposées sur des lames portant de l'eau distillée, puis défripées sur une plaque chauffante à une température très douce. Les lames portant les coupes défripées ont été séchées dans l'étuve à 37°C durant au moins une nuit.

La coloration des lames s'est faite suivant le protocole de coloration à l'érythrosine/hémalum de Mayer (HE). Brièvement, les lames séchées ont été déparaffinées dans 2 bains de xylène de 3 min chacun, puis réhydratées dans 2

bains d'alcool décroissant (100° et 95°) pendant 3 min chacun. Les coupes déparaffinées et réhydratées ont ensuite été plongées dans un bain d'hémalum de Mayer prêt à l'emploi pendant 5 min pour colorer les noyaux en bleu. Après rinçage à l'eau de robinet pendant 1 min, les coupes ont été différenciées pendant 10 secondes dans un bain d'alcool à 95° acidifié avec du HCl (200 mL d'alcool pour 2 mL de HCl). Après rinçage pendant 1 min, les coupes différenciées ont été plongées dans un bain d'érythrosine B (0,8 g d'érythrosine B pour 100 mL d'eau distillée + 0,1 mL d'acide acétique) pendant 2 min pour colorer le cytoplasme en rose. Les lames sorties de l'érythrosine ont ensuite été rincées puis déshydratées dans 2 bains d'alcool de degré croissant (95° et 100°) et 2 bains de xylène pendant 3 min chacun. Sorties du dernier bain, les coupes colorées ont été montées entre lame et lamelle avec de l'eukitt. Les lames séchées ont été lues sous microscope (Leica DM 5500B) à la lumière blanche.

II-11-2- Analyse immunohistochimique : Marquage PCNA de la prolifération cellulaire

- Coupes, déparaffinage, réhydratation et marquage à l'anticorps primaire

Pour le marquage PCNA, les coupes d'organes ont été réalisées à partir des blocs d'organes précédents. Ces coupes ont été déposées sur des lames, puis séchées, déparaffinées et réhydratées comme précédemment décrit. Les lames réhydratées ont ensuite été incubées pendant 10 minutes au micro-ondes à 600W, dans une solution de Tris-sodium 0,01M ; pH 6 (2,9 g de tris sodium citrate dans 1litres d'eau distillée ; pH ajusté à 6 avec du HCl 12N). Les lames sorties du micro-ondes ont été rincées dans 2 bains successifs de PBS-Triton (PBS 1x + 0,1% de triton) pendant 5 minutes chacun puis incubées dans du BSA 5% pendant 30 minutes pour la saturation des coupes. Après saturation, une surface de dépôt autour de chaque coupe a été délimitée à l'aide d'un marqueur prévu à cet effet et l'anticorps primaire PCNA (FL-261) lapin dilué au 1/50^{ème} dans du PBS tween + sérum de chèvre (PBS 1X + 0,05% de tween 20 + 5% de sérum de chèvre) y a été déposé. Les coupes portant l'anticorps ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4°C.

- Marquage à l'anticorps secondaire et montage des lames

Le lendemain, les lames ont été lavées au PBS-triton comme précédemment décrit. L'anticorps secondaire (« goat anti-rabbit Alexa 488 ») dilué au 100^{ème} dans du PBS-tween (PBS 1X + 0,05% de tween 20) a ensuite été déposé et les lames ont été incubées à température ambiante pendant 1h. Après incubation, les lames ont été lavées dans 2 bains de PBS-triton puis dans un bain d'eau pour enlever le PBS-triton des coupes. Les coupes lavées ont ensuite été marquées au DAPI (1mL de milieu de montage + 1µL de Hoestch) puis recouvertes d'une lamelle. Les lames séchées à l'abri de la lumière ont été lues sous microscope (Leica DM 5500B) à fluorescence.

II-12- DOSAGES DES TRANSAMINASES SÉRIQUES- DOSAGE DES PROTÉINES ET DES MARQUEURS DU STRESS OXYDANT DANS LE FOIE

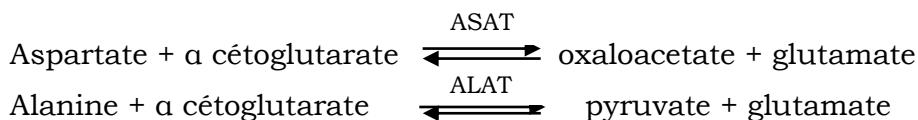
II-12-1- Dosage des transaminases sériques

Le dosage des transaminases a été réalisé suivant deux méthodes différentes en fonction des expérimentations. Pour les expérimentations faites sur les C57BL/6, les transaminases ont été dosées en routine hospitalière à l'aide d'un analyseur automatique au CBP (Centre de Biologie et Pathologie) du Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Lille.

Pour les expérimentations faites sur les BALB/C, les transaminases ont été dosées à l'aide de kit de dosage colorimétrique (« Fortress diagnostics ») conformément aux instructions du fabricant.

Principe

L'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT) catalysent les réactions suivantes :



Le pyruvate ou l'oxaloacétate formé est dosé sous forme de leurs dérivés 2,4 dinitrophénylhydrazones absorbants à 505 nm en présence du NaOH. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de pyruvate ou de l'oxaloacétate dans le milieu et donc à l'activité de l'ALAT et de l'ASAT.

Mode opératoire

Le dosage colorimétrique de l'ALAT et ASAT dans les échantillons s'est fait comme l'indique le tableau IV.

Tableau IV : **Protocole de dosage des transaminases sériques (ALAT et ASAT)**

	Blanc	Test
Echantillons (µL)	-	100
Tampon (µL)	500	500
Eau distillée (µL)	100	-
Mélange puis incubation dans un bain-marie à 37° pendant 30 minutes		
Réactif de coloration (µL)	500	500
Mélange puis incubation à température ambiante pendant 20 minutes		
NaOH (0,4N) (mL)	5	5
Mélange puis lecture après 5 minutes, à 546 nm contre un blanc		

Pour le dosage de l'ALAT, le tampon fourni dans le kit était composé du tampon phosphate à 100 mmol/L, de L-Alanine à 200 mmol/L et de l'oxoglutarate à 2 mmol/L. Pour le dosage de l'ASAT le tampon était composé du tampon phosphate à 100 mmol/L, de L-Aspartate à 200 mmol/L et de l'oxoglutarate à 2 mmol/L. Le réactif de coloration pour les deux dosages était composé du 2,4-Dinitrophénylhydrazine à 2 mmol/L.

La courbe d'étalonnage de l'ALAT et de l'ASAT a été réalisée comme décrit dans le tableau V :

Tableau V : Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage des transaminases (ALAT et ASAT).

Tube	Pyruvate standard (2 mmol/L) en mL	Eau distillée (mL)	Tampon ALAT ou ASAT (mL)	Concentration d'ALAT (U/L)	Concentration d'ASAT (U/L)
1	0	0,2	1	-	-
2	0,05	0,2	0,95	9	6
3	0,10	0,2	0,90	18	11
4	0,15	0,2	0,85	27	16
5	0,20	0,2	0,80	37	20
6	0,25	0,2	0,75	46	25
7	0,30	0,2	0,70	56	31
8	0,35	0,2	0,65	67	37
9	0,40	0,2	0,60	77	44
10	0,45	0,2	0,55	87	52

Mélange puis rajout de 1mL de réactif de coloration dans chaque tube. Mélange puis incubation à température ambiante pendant 20 minutes. Ajout de 10mL de NaOH dans chaque tube. Mélange puis lecture à 546 nm après 5 minutes

Méthode de calcul

L'activité de l'ALAT et de l'ASAT dans les échantillons a été déterminée à partir des différentes courbes d'étalonnage.

II-12-2- Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford

Principe

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique des protéines en solution. Le réactif utilisé est le bleu de coomassie qui, ajouté à une solution contenant des protéines, et dans des conditions de pH acide, se lie à la protéine par des interactions non covalentes. Sous sa forme libre (rouge), la longueur d'onde d'absorption du réactif varie entre 465 et 470nm. Sous sa forme liée à la protéine, elle est estimée au maximum à 595 (bleu). Ce changement d'absorbance entre la forme libre et la forme liée est la base de la méthode et est proportionnel à la quantité de réactif liée aux protéines et donc à la concentration en protéines des

échantillons. La concentration en protéine des échantillons est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage à partir d'une protéine standard.

Mode opératoire

Le réactif de Bradford prêt à l'emploi (SIGMA) a été utilisé pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford. Les échantillons à doser ont été préalablement dilués au 20^{ème} dans le but d'avoir des concentrations d'échantillon comprises entre 0,1-1,4 mg/mL, conformément aux instructions du fabricant. Cinq microlitres des échantillons ainsi dilués ont été déposés dans une plaque de 96 puits, 250 µL du réactif de Bradford ont ensuite été ajoutés dans chaque puits. Le mélange était mixé pendant 30 secondes puis incubé à température ambiante pendant 5 à 45 minutes. La plaque était ensuite lue dans un lecteur de plaque Elisa à 595 nm. La courbe d'étalonnage a été réalisée à partir de la BSA (« Bovin Serum Albumin ») comme indiqué dans le tableau VI :

Tableau VI : Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage des protéines

N° du tube	Concentration de la BSA standard (mg/mL)	Volume de BSA (mL)	Volume du réactif de Bradford (mL)
1	0	0,1	3
2	0,25	0,1	3
3	0,5	0,1	3
4	1,0	0,1	3
5	1,4	0,1	3

La plaque a été incubée à température ambiante pendant 5 à 45 minutes puis lue à 595 nm.

Méthode de calcul

La concentration en protéines dans nos échantillons a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la BSA.

II-12-3- Evaluation des paramètres du stress oxydant hépatique

II-12-3-1- Dosage de la catalase

Principe

En présence de la catalase, le peroxyde d'hydrogène est rompu. Ainsi détruit, le peroxyde se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu-vert d'acide perchlorique instable. Ce précipité instable sera ensuite décomposé par la chaleur et formera un complexe vert qui absorbe à 570 nm. L'activité de la catalase est de ce fait proportionnelle à la densité optique et sera déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage [192].

Mode opératoire

Une solution aqueuse de dichromate de potassium à 5% est préalablement préparée. A 50 mL de cette solution, est ajouté lentement 150 mL d'acide acétique glacial. Ensuite sont préparés, une solution de peroxyde d'hydrogène à 50 mM et un tampon phosphate 0,1M ; pH 7,5. Pour réaliser la courbe d'étalonnage et le test, les différents réactifs sont mélangés comme indiqué sur les tableaux VII et VIII.

Tableau VII : **Protocole de réalisation de la Courbe d'étalonnage de la catalase**

N° de tube	1	2	3	4	5
H ₂ O ₂ (50 mM) (µL)	0	20	40	80	160
Solution de Dichromate/acide acétique (mL)	2	2	2	2	2
Après formation du précipité bleu, les tubes sont chauffés jusqu'à ébullition pendant 10 min, temps nécessaire à l'apparition de la couleur verte de l'acétate chromique. Après refroidissement des tubes à température ambiante, l'eau distillée est rajoutée dans les différents tubes.					
Eau distillée (µL)	1000	980	960	920	840
L'absorbance des différents tubes est lue à 570nm					

Pour les tests, les réactifs sont mélangés comme suit :

Tableau VIII : Protocole de dosage de la catalase dans les échantillons

Tubes	Blanc	Echantillons X1.....Xn
Homogénats (μL)	0	50
Tampon phosphate (0,1M ; pH 7,5) (μL)	800	750
Déclenchement du chronomètre (1minute) et ajout de H_2O_2 (50mM) (μL)	200	200
Après 1 minute, arrêt de la réaction par ajout de la solution de dichromate/acide acétique (mL)	2	2

Les tubes ont été chauffés à 100° pendant 10min, puis refroidis à température ambiante. La densité optique était lue à 570nm.

NB : Faire attention à la concentration de H_2O_2 (50mM) et au pH du tampon phosphate

Méthode de calcul

La quantité de peroxyde d'hydrogène restant dans chaque tube est évaluée en utilisant la courbe d'étalonnage (Tableau VII). L'activité spécifique de la catalase est exprimée en μM de H_2O_2 /min/mg de protéine.

II-12-3-2- Dosage du glutathion réduit

Principe

L'acide 2,2-dithio-5,5'-nitrodibenzoïque (DTNB) réagit avec les groupements thiols (-SH) du glutathion pour former un complexe jaune absorbant à 412 nm [193].

Réactifs

La solution tampon Tris-HCl 50 mM ; pH 7,4 a été préparée en dissolvant 1,21 g de tris base et 2,79 g de KCl dans 250 mL d'eau distillée. Après dissolution complète du tris base et du KCl, le volume a été complété à 500 mL et le pH ajusté à 7,4 par ajout de HCl 11,8N.

La solution tampon phosphate 0,1M ; pH 6,5 a été préparé en dissolvant 3,48 g de phosphate disodique hydraté ($\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) et 1,07 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dans 250 mL d'eau distillée. Le pH était ensuite ajusté à 6,5.

Mode opératoire

Dans un tube, a été introduit 0,02 mL d'échantillon à doser (homogénat de foie), 0,02 mL de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 et 3 mL de réactif d'Ellman (4,96 mg de DTNB +250 mL de tampon phosphate 0,1M ; pH 6,5). Le tube blanc contenait 0,02 mL d'eau distillée, 0,02 mL de tampon Tris et 3 mL de réactif d'Ellman. Après agitation, tous les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 60 minutes pour laisser se développer une coloration jaune. L'absorbance de chaque tube était ensuite lue à 412 nm contre le blanc.

Méthode de calcul

La concentration en glutathion (GSH) a été calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire, $\epsilon = 13600/\text{mole.cm}$.

$$\text{GSH (mol/mg)} = (1/ \text{masse de l'organe} \times \epsilon) (\text{Abs} \times \text{Volume total}) \times 1 \times \text{Volume initial}$$

II-12-3-3- Dosage de la Superoxyde Dismutase

Principe

Dans les échantillons à doser (homogénats de foie), la présence de superoxyde dismutase (SOD) inhibe l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome. L'augmentation de l'absorbance qui est proportionnelle à l'activité de la superoxyde dismutase est mesurée entre 20 et 80 secondes à 480 nm [194].

Mode opératoire

Un volume de l'échantillon à doser (134 μL) a été déposé dans une cuve de spectrophotométrie, puis 1666 μL de tampon carbonate (0,05 M, pH 10,2) ont été ajoutés. Le tube blanc contenait 134 μL d'eau distillée et 1666 μL de tampon carbonate. Pour déclencher la réaction, 0,2 μL d'adrénaline (0,3 mM) était ajouté dans chaque cuve. Après homogénéisation rapide du mélange, l'absorbance était lue à 480 nm à la 20^{ème} et 80^{ème} seconde. Pour le dosage de la SOD-2 (MnSOD) les échantillons étaient préalablement incubés avec du KCN (cyanure de potassium) à 8 mmol/L pendant 45 minutes. Ceci dans le but de désactiver les CuZn-SOD (SOD-1 et 3).

Le tampon carbonate (0,05 M, pH 10,2) a été préparé en dissolvant 4,3 g de carbonate de sodium ($\text{Na}_2\text{CO}_3, 10\text{H}_2\text{O}$) et 4,2 g de bicarbonate de sodium (NaHCO_3)

dans 900 mL d'eau distillée. Le volume a été complété à 1000 mL et le pH ajusté à 10,2.

Méthode de calcul

L'activité spécifique de la SOD est exprimée en unité de SOD/mg de protéine. Une unité de SOD est définie comme la quantité de SOD nécessaire pour causer 50% d'inhibition de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome pendant 1min. L'activité spécifique de SOD (unités SOD/ mg de protéines) = (Nombre d'unités SOD/mL) / mg de protéines X facteur de dilution.

La variation de la densité optique : $\Delta A_{\min} = \Delta 20s - \Delta 80s$

% inhibition = $100 - (\Delta A_{\text{Ech}} \times 100) / \Delta A_{\text{Blanc}}$

50% d'inhibition correspond à 1 unité

X% d'inhibition correspond à N unités.

II-12-3-4 Dosage du malondialdéhyde

Principe

Les aldéhydes réagissent avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud pour donner un produit de couleur rouge qui absorbe à 530 nm. Ainsi, le malondialdéhyde (MDA) contenu dans les échantillons à doser réagit avec l'acide thiobarbiturique (TBA) à 95°C pour former un produit quantifiable par colorimétrie ou fluorométrie. Les peroxydes résultants se décomposent en composés volatils responsables de l'odeur de rance [195].

Mode opératoire

Le dosage de la malondialdéhyde (MDA) dans le foie a ainsi été réalisé à l'aide du kit de dosage TBARS (« Thiobarbituric Acid Reactives Substances ») de CELL BIOLABS, conformément aux instructions du fabricant. En effet, 100 µL d'échantillon ou du standard ont été déposés dans des tubes puis 100 µL de solution de lyse SDS ont été ajoutés. Le mélange a été mixé vigoureusement puis incubé à température ambiante pendant 5 minutes. Deux cent cinquante microlitres d'acide thiobarbiturique (TBA) ont ensuite été ajoutés et les tubes ont été fermés, puis incubés à 95°C pendant 60 minutes. Après incubation, tous les tubes ont été refroidis dans un bain de glace pendant 5 minutes ; puis centrifugés à

3000 rpm pendant 15 minutes. Pour prévenir l'interférence avec l'hémoglobine et/ou ses dérivés dans les échantillons à doser, 300 µL de chaque surnageant ont été transférés dans des tubes avec 300 µL de n-butanol. Le mélange était ensuite mélangé vigoureusement pendant 1 à 2 minutes puis centrifugé pendant 5 minutes à 10 g. Deux cent microlitres de la fraction butanolique ont été transférés dans une microplaque de 96 puits et les absorbances étaient lues dans un lecteur de plaque Elisa, à 532 nm, contre un blanc. La courbe d'étalonnage de MDA a été réalisée comme l'indique le tableau IX.

Tableau IX : Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage du MDA

N° de tube	MDA standard (µL)	Eau distillée (µL)	MDA standard (µM)
1	125	875	125
2	250 du tube 1	250	62,5
3	250 du tube 2	250	31,25
4	250 du tube 3	250	15,63
5	250 du tube 4	250	7,81
6	250 du tube 5	250	3,91
7	250 du tube 6	250	1,95
8	250 du tube 7	250	0,98
9	0	250	0,0

Méthode de calcul

La concentration en MDA dans nos échantillons a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage du MDA.

II-12-3-5- Dosage des nitrites

Principe

Les nitrites en milieu acide et en présence de l' amino-4-benzènesulfonamide (sulfanilamide) et du dichlorure de N-(naphtyl-1)-diamono-1,2-éthane (N-1-naphtyléthylènediamine) subissent une réaction de diazotation. Le produit de cette réaction de diazotation absorbe à 546 nm et est proportionnel à la quantité de nitrites présents dans l'échantillon à doser [196].

Réactifs

La solution d'acide phosphorique à 2,5 % a été préparée en diluant 2,5 mL, d'acide phosphorique dans de l'eau en qsp 100 mL.

La solution de sulfanilamide 1%/ acide phosphorique à 2,5 % a été préparée en dissolvant 1g de sulfanilamide dans 100 mL d'une solution d'acide phosphorique à 2,5%.

La solution de NED 0,1% (naphtyléthylènediamide) a été préparée en dissolvant 0,1 g de NED dans 100 mL d'eau distillée.

La solution standard de NaNO_2 1mM (nitrite de sodium) a été préparée en dissolvant 0,69 g de NaNO_2 dans 10 mL d'eau distillée.

Mode opératoire

Le tableau X récapitule le protocole de dosage des nitrites dans les échantillons et la réalisation de la courbe d'étalonnage.

Tableau X : **Protocole de dosage des nitrites et de réalisation de la courbe d'étalonnage.**

Tubes	0	1	2	3	4	5	6	Xi...Xn	
	Blanc	Etalons							Echantillons
Concentration de NaNO_2 (μM)	0	0,312	0,625	0,125	0,250	0,5	1	-	
Volume de NaNO_2 (μL)	100	100	100	100	100	100	100	-	
Echantillon (μL)	-	-	-	-	-	-	-	100	
Eau distillée (μL)	400	400	400	400	400	400	400	400	
Sulfanilamide/acide phosphorique (μL)	400	400	400	400	400	400	400	400	
Incubation des tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 5 minutes									
Solution de NED 0,1% (μL)	400	400	400	400	400	400	400	400	

Les tubes ont été incubés à l'abri de la lumière pendant 5 minutes. Les absorbances ont été lues contre le blanc (tube 0) à 546 nm dans les 30 minutes suivant la dernière incubation.

Méthode de calcul

La concentration en nitrites dans les échantillons était calculée à partir de la courbe d'étalonnage du NaNO_2 .

II-13- ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ESM (erreur standard à la moyenne). Le test non paramétrique de Mann Whitney a été utilisé pour analyser la différence entre deux groupes indépendants (tests *in vivo*). Pour la comparaison de trois groupes indépendants ou plus (tests *in vitro* sur les cellules), le test ANOVA à un facteur suivi du post test de Turkey a été utilisé.

Tous les groupes étaient comparés par rapport aux contrôles. Pour l'analyse des poids corporels, la comparaison a été faite entre différents groupes, chacun par rapport au contrôle (comparaison intergroupe) et dans un même groupe, chaque jour par rapport au premier jour de traitement à l'extrait. Le logiciel GraphPad Prism 5 a été utilisé pour le calcul des IC₅₀ et de toutes les autres analyses. La différence entre deux groupes était considérée significative à $p < 0,05$.

CHAPITRE III : RESULTATS

Ce chapitre présente les principaux résultats obtenus à partir de notre méthodologie. Il présente les profils phytochimique, toxicologique et thérapeutique des deux extraits aqueux et éthanolique, ainsi que les différents composés obtenus après fractionnement de l'extrait aqueux.

III-1- PROFILS PHYTOCHIMIQUES DES EXTRAITS DE *N. VELUTINA*

III-1-1- Profils qualitatifs des extraits de *N. velutina*

Les tests phytochimiques qualitatifs réalisés sur les extraits de *Neoboutonia velutina* ont révélé l'absence des groupes de composés tels que les polyphénols, les alcaloïdes et les tannins dans les deux extraits (aqueux et éthanolique). Il a cependant été noté la présence des stérols, polyterpènes et lipides dans l'extrait éthanolique alors que l'extrait aqueux contient des glycosides et des saponines (Tableau XI).

Tableau XI : **Récapitulatif des composés supposés bioactifs dans les extraits de *N. velutina*.**

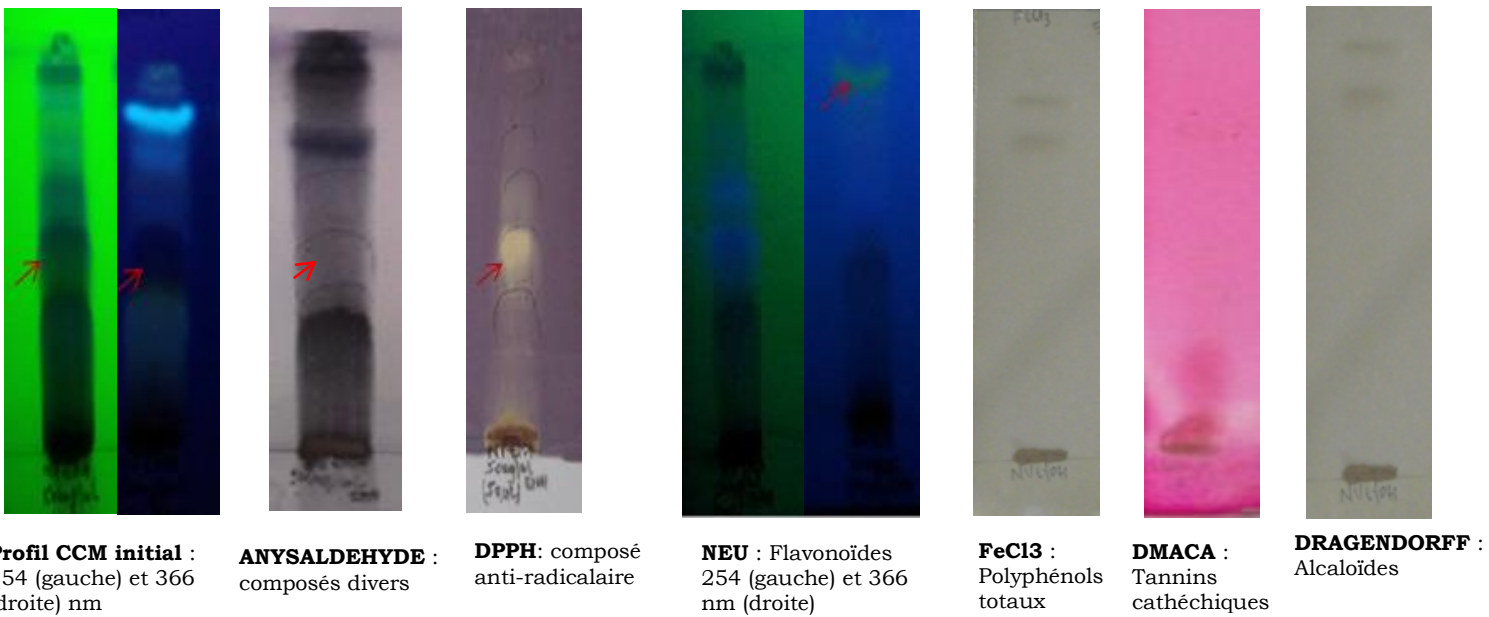
	Extrait aqueux (NVH)	Extrait éthanolique (NVE)
Polyphénols	-	-
Alcaloïdes	-	-
Tannins	-	-
Stérols et polyterpènes	-	++
Glycosides	++	-
Saponines	+++	-
Lipides	-	+

(+) = Présence (-) = Absence

III-1-2- Profils analytiques en chromatographie sur couche mince (CCM)

La révélation des différentes plaques de CCM avec différents révélateurs, a conduit à la mise en évidence de la présence des composés antiradicalaires dans les extraits de *N. velutina* et à la confirmation de l'absence des alcaloïdes, des tannins cathéchiques (proanthocyanidines) et des polyphénols totaux. La présence ou non des flavonoïdes reste ambiguë compte tenu de la réponse atypique de nos extraits après le test de NEU (Figure 8A et 8B).

A



B

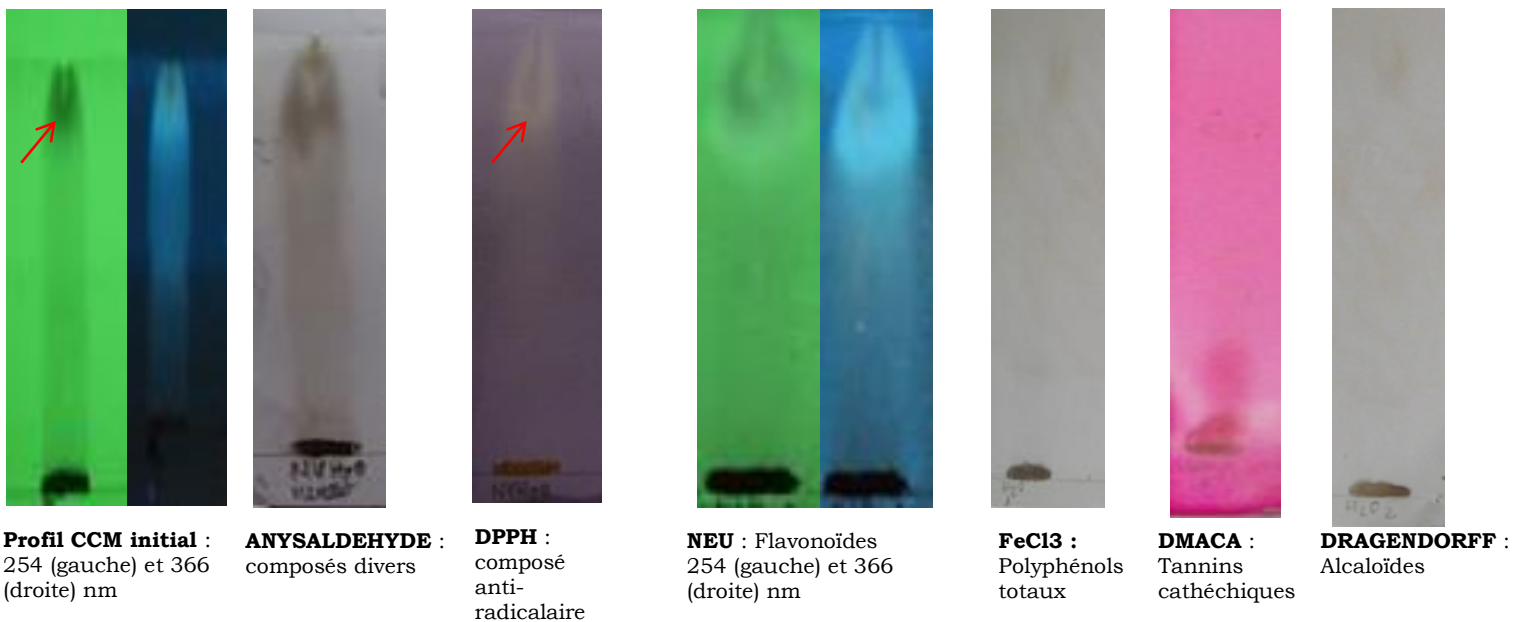


Figure 8 : CCM analytique des extraits de *N. velutina* avant et après révélation

A : CCM analytique de l'extrait éthanolique ; B : CCM analytique de l'extrait aqueux,

III-1-3- Profils chromatographiques des extraits de *N. velutina* en Chromatographie Liquide sous Haute Pression

Le profil chromatographique des extraits de *N. velutina* (Figure 9) a révélé la présence de plusieurs pics de composés dans les différents extraits. Entre la 5^{ème} et la 12^{ème} minute, on remarque dans l'extrait à l'éthanol, l'apparition de plusieurs composés minoritaires absorbants aux longueurs d'onde 254 et 366 nm, exception faite du composé qui apparaît entre la 11^{ème} et la 13^{ème} minute. On note également dans le même extrait, un pic de composés majoritaires sortant entre la 13^{ème} et la 15^{ème} minute et absorbant à 254 et 366 nm. De même entre la 17^{ème} et la 20^{ème} minute on note un pic de composés absorbant uniquement à 366 nm (Figure 9A). Quant à l'extrait aqueux, on remarque entre la 5^{ème} et la 19^{ème} minute, l'apparition de plusieurs composés minoritaires absorbants à 254 nm. A partir de la 20^{ème} minute, on note une sortie massive de composés absorbants à 254 nm avec un pseudo pic majoritaire absorbant aux 2 longueurs d'onde entre la 42^{ème} et la 45^{ème} minute (Figure 9B).

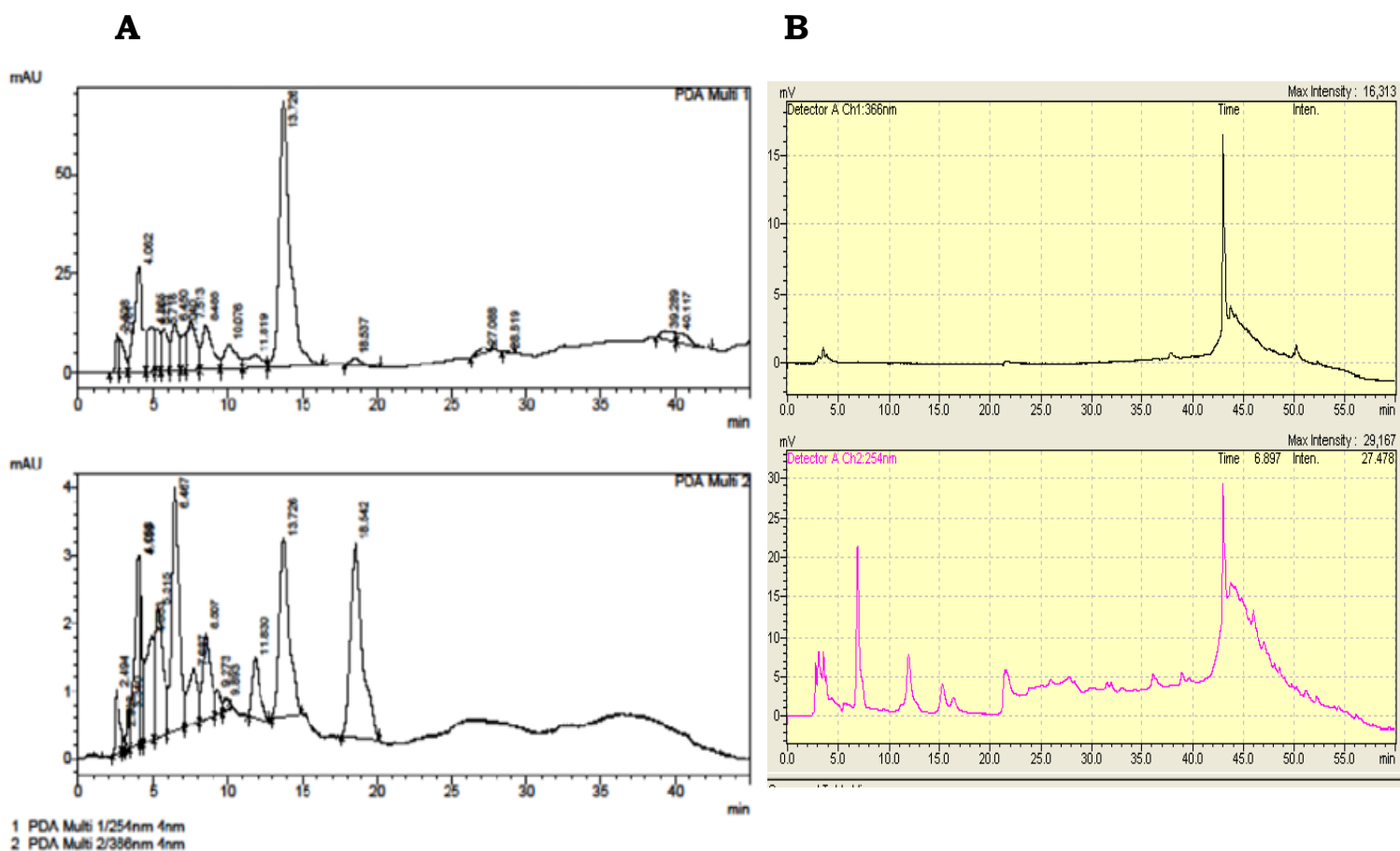


Figure 9 : Profil HPLC des extraits totaux de *N. velutina*.

A : Profil de l'extrait à l'éthanol (NVE), B : Profil de l'extrait aqueux (NVH)

III-2- CAPACITE ANTIOXYDANTE *IN VITRO* DES EXTRAITS DE *NEOBOUTONIA VELUTINA*

III-2-1- Pouvoir antioxydant total des extraits

La figure 10 montre la courbe dose-réponse du pouvoir antioxydant total (TAC) des extraits de *N. velutina* comparés à la vitamine C. Il y est observé, une augmentation dose-dépendante du pouvoir antioxydant de la vitamine C et des extraits. Le pouvoir antioxydant de la vitamine C apparait plus marqué que celui des extraits en atteignant un plateau aux fortes doses tandis que celui des extraits apparait plus modéré mais continu. Le pouvoir antioxydant total de l'extrait éthanolique (NVE) s'avère être néanmoins plus marqué que celui de l'extrait aqueux (NVH).

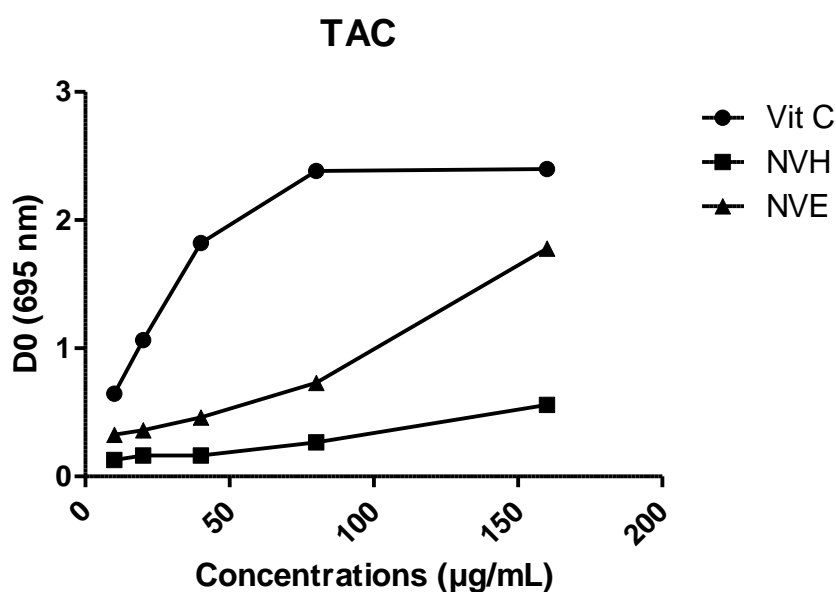


Figure 10 : Pouvoir antioxydant total des extraits de *N. velutina*

Chaque point représente la moyenne des DO par concentration, n=2 répétitions
NVH=extrait aqueux, NVE= extrait éthanolique, Vit C= vitamine C

III-2-2- Taux de polyphénols totaux dans les extraits de *N. velutina*

Les polyphénols totaux des extraits de *N. velutina* ont été quantifiés en comparaison à l'acide gallique (Figure 11). Il a été noté très peu de polyphénols dans les extraits comparés à l'acide gallique. Ainsi, à une concentration de 100 µg/mL, tandis qu'on note une quantité de polyphénols égale à $49,17 \pm 0,04$ µg/g d'équivalent d'acide gallique dans l'acide gallique, on note dans l'extrait éthanolique une quantité de $0,53 \pm 0,025$ µg/g d'équivalent d'acide gallique et dans l'extrait aqueux, une quantité de $1,19 \pm 0,29$ µg/g d'équivalent d'acide gallique.

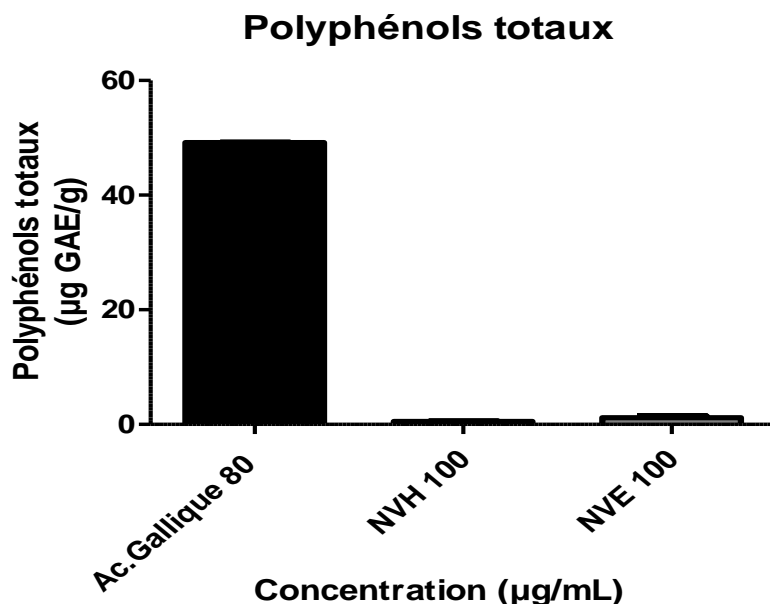


Figure 11 : **Quantité de polyphénols totaux dans les extraits de *N. velutina***

Les barres représentent la quantité de polyphénols totaux dans les extraits, n=3
NVH= extrait aqueux, NVE= extrait éthanolique, Ac. Gallique= acide gallique

III-2-3- Pouvoir réducteur du fer des extraits de *N. velutina*

Le pouvoir réducteur de fer des extraits a été évalué en comparaison à la vitamine C et au BHT (« Butylated Hydroxytoluene »). La figure 12 révèle pour la vitamine C et le BHT, un pouvoir réducteur de fer, évoluant de façon dose-dépendante de 0 à 400 µg/mL. Un pouvoir réducteur très faible et constant comparé à la vitamine C et au BHT a été observé pour l'extrait aqueux et éthanolique. Les deux extraits comparés entre eux présentent un pouvoir réducteur similaire.

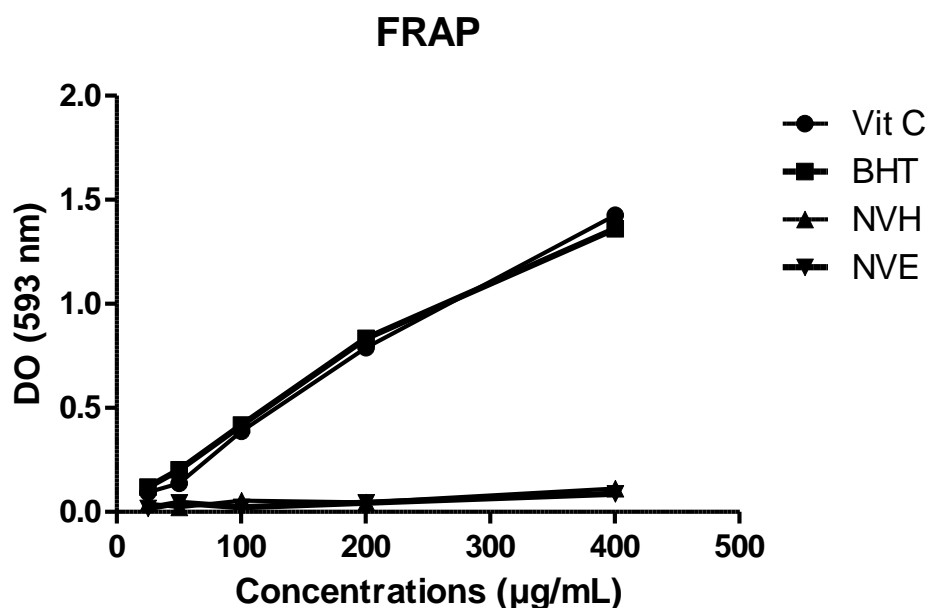


Figure 12 : Pouvoir réducteur de fer des extraits de *N. velutina*

Chaque point représente la moyenne des DO par concentration, n=3 répétitions
VIT C= vitamine C, BHT= butylated hydroxy toluene, NVH= extrait aqueux, NVE= extrait éthanolique

III-2-4- Capacité antiradicalaire au DPPH

La figure 13A présente l'activité antiradicalaire des extraits de *N. velutina* en comparaison avec la vitamine C et le BHT. Il en ressort une activité antiradicalaire modérée et constante des extraits tandis que, la vitamine C et le BHT présentent une activité forte et dose-dépendante. A la concentration de 400 µg/mL, la vitamine C s'avère être le meilleur antiradicalaire avec un pourcentage d'inhibition de

95,68% suivie du BHT (74,88%), puis de l'extrait éthanolique (35,67%) et enfin de l'extrait aqueux (25,65%). Les figures 13B, 13C et 13D représentent les courbes des concentrations inhibitrices 50 (IC₅₀) des extraits et de la vitamine C. On note ainsi des IC₅₀ de 16,70 ; 25,04 et 25,48 µg/mL pour la vitamine C, l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique respectivement.

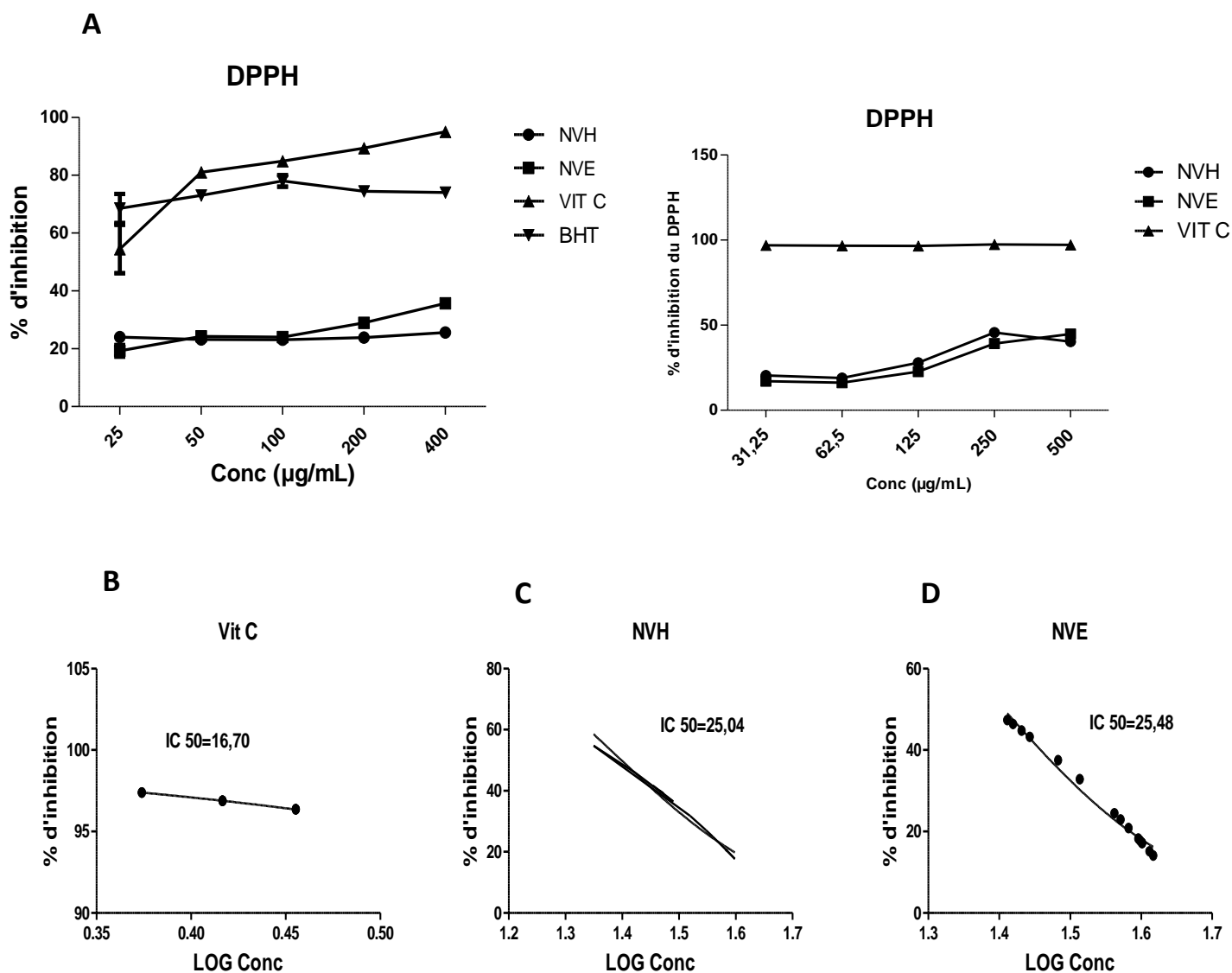


Figure 13 : Capacité anti-radicalaire au DPPH des extraits de *N. velutina*

Chaque point représente la moyenne par concentration, n=3

A : capacité antiradicalaire des extraits comparés à la vitamine C et au BHT ;

B, C et D : courbes des IC₅₀ des extraits et de la vitamine C ;

NVH : extrait aqueux de *N. velutina*, NVE : extrait éthanolique de *N. velutina*,

VIT C: vitamine C, BHT: butylated hydroxytoluene, DPPH: 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

III-2-5- Caractérisation de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux

III-2-5-1- Composition minérale de l'extrait aqueux de *N. velutina*

L'analyse minérale de l'extrait aqueux a révélé la présence des macro-minéraux (Ca, Mg, K, Na) et des micronutriments (Zn, Cu, Mn, Fe) avec une teneur en matière minérale totale de 44,83 %. Comme macro-minéraux, on note 5,78 mg de Ca par gramme de matière sèche d'extrait, 20,34 mg de Mg, 149,80 mg de K et 1,25 mg de Na. Comme micronutriments, il est noté 20,49 µg de Zn par gramme de matière sèche d'extrait, 33,68 µg de Cu, 364,93 µg de Mn et 313,77 µg de Fe. L'extrait aqueux de *N. velutina* s'avère fortement concentré en K et Mg, moyennement concentré en Ca, Na, Mn et Fe et faiblement concentré en Cu et Zn (Tableau XII).

Tableau XII : **Composition minérale de l'extrait aqueux de *N. velutina***

Macro-minéraux	(mg/g)	Micro nutriments	(µg/g)
Ca	5,78 ± 0,14	Zn	20,49 ± 0,34
Mg	20,34 ± 0,21	Cu	33,68 ± 0,07
K	149,80 ± 0,45	Mn	364,93 ± 0,43
Na	1,25 ± 0,01	Fe	313,77 ± 1,91
Matière minérale totale (%)			44,83 ± 0,09

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM pour une répétition.

III-2-5-2- Pouvoir antioxydant total et cinétique de l'activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux

Le pouvoir antioxydant total de l'extrait aqueux a été évalué *in vitro* en comparaison à la vitamine C et à la silymarine (Figure 14A). L'extrait aqueux tout comme la silymarine, présente un pouvoir antioxydant plus modéré comparativement à la vitamine C qui, de façon dose-dépendante, présente un fort pouvoir antioxydant total. Toutefois, le pouvoir antioxydant de la silymarine semble plus important que celui de l'extrait.

En ce qui concerne la cinétique de l'activité antiradicalaire au DPPH, on observe de façon dose et temps dépendent, une forte capacité de l'extrait à inhiber le DPPH. Cette inhibition par l'extrait aqueux atteint 65% environ au bout de 120 min. Les taux d'inhibition de la vitamine C et de la silymarine atteignent 95% dans les 5 premières minutes (Figure 14B).

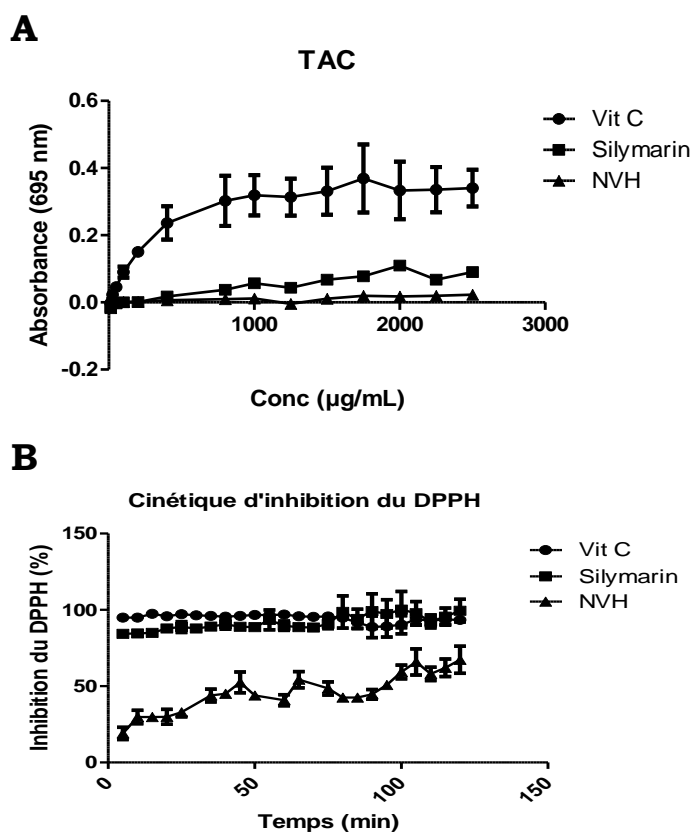


Figure 14 : Pouvoir antioxydant total et cinétique d'inhibition du DPPH par l'extrait aqueux

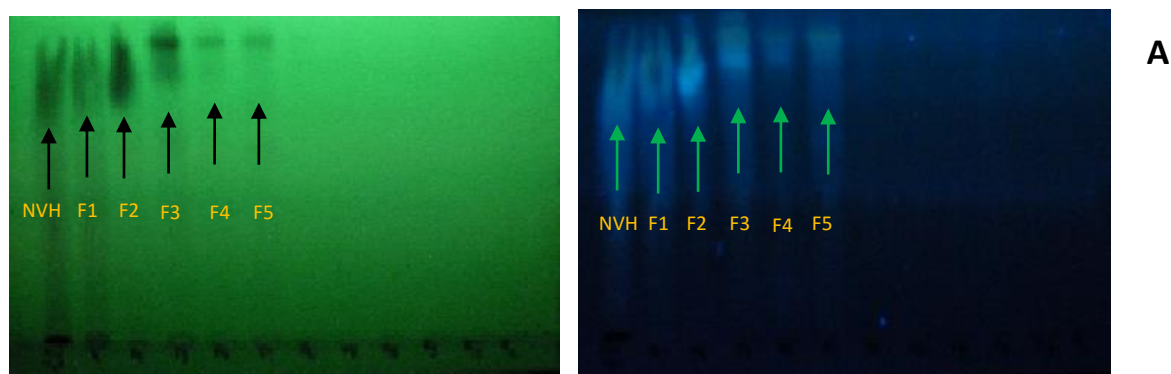
Chaque point représente la moyenne par concentration, n=3

A : Pouvoir antioxydant total de l'extrait aqueux total en comparaison à la vitamine C et la silymarine. B : Cinétique d'inhibition du DPPH par l'extrait aqueux total en comparaison à la vitamine C et la silymarine.

III-3- FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT AQUEUX DE *N. VELUTINA*

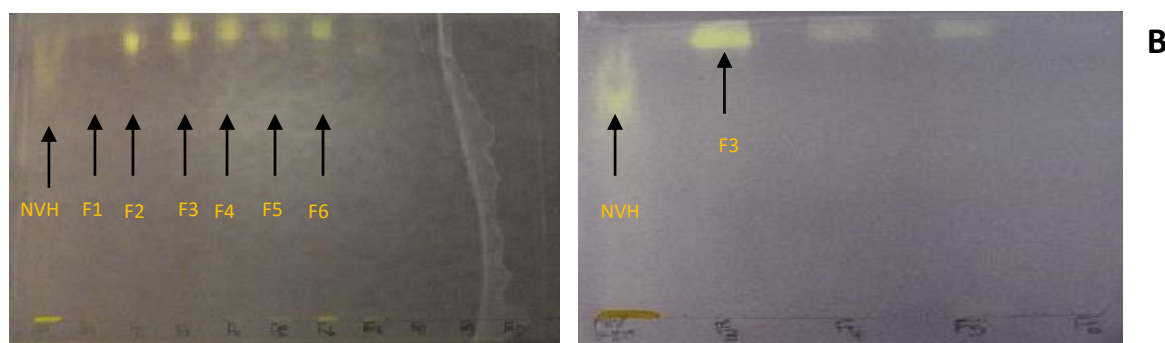
III-3-1- Révélation des composés et mise en évidence des fractions anti-radicalaires par CCM analytique

Le fractionnement de l'extrait aqueux de *N. velutina*, sous colonne de séphadex, a permis d'obtenir une dizaine de fractions parmi lesquelles 6 fractions présentant des composés visibles sous UV (Figure 15A). L'analyse des 6 fractions en Chromatographie sur Couche Mince analytique montre que les fractions F2, F3, F4, F5 et F6 présentent une activité anti-radicalaire au DPPH. La fraction F3 apparaît être la plus concentrée en composés anti-radicalaire, de par l'intensité plus forte de la couleur jaune, signe d'une activité anti-radicalaire au DPPH (Figure 15B). Par ailleurs, la révélation des plaques au réactif de NEU et au DMACA pour la mise en évidence des flavonoïdes et des proanthocyanidines respectivement, a révélé l'absence des flavonoïdes et des proanthocyanidines dans ces fractions.



Fractions (F1-F11) sous UV254

Fractions (F1-F11) sous UV366



Révélation des fractions anti-radicalaires : F2-F6

Figure 15 : Révélation des fractions et mise en évidence des fractions anti-radicalaires

A : Révélation des composés sous UV à 254 et 366, B : Identification des fractions antiradicalaire

III-3-2- Capacité anti-radicalaire au DPPH de la fraction F3

Le dosage de la capacité anti-radicalaire au DPPH de la fraction F3 est représenté sur la figure 16, en comparaison à l'extrait aqueux total de *N. velutina* et à la vitamine C. On note ainsi pour la fraction F3, un pouvoir anti-radicalaire dose dépendant. Comparé à l'extrait total et à la vitamine C, la fraction F3 présente une activité anti-radicalaire plus forte que celle de l'extrait total mais un peu moins forte que celle de la vitamine C. Ainsi à la concentration de 500 µg/mL, la vitamine C s'avère être le meilleur anti-radicalaire avec 96,35±0,00% d'inhibition suivi de la fraction F3 avec 74,13±1,76% d'inhibition puis de l'extrait total avec 33,33±1,88% d'inhibition (Figure 16A). De même, la vitamine C présente le plus faible IC₅₀ (16,70) suivi de F3 (22,91) puis de l'extrait total (28,00) (Figures 16B, 16C, 16D).

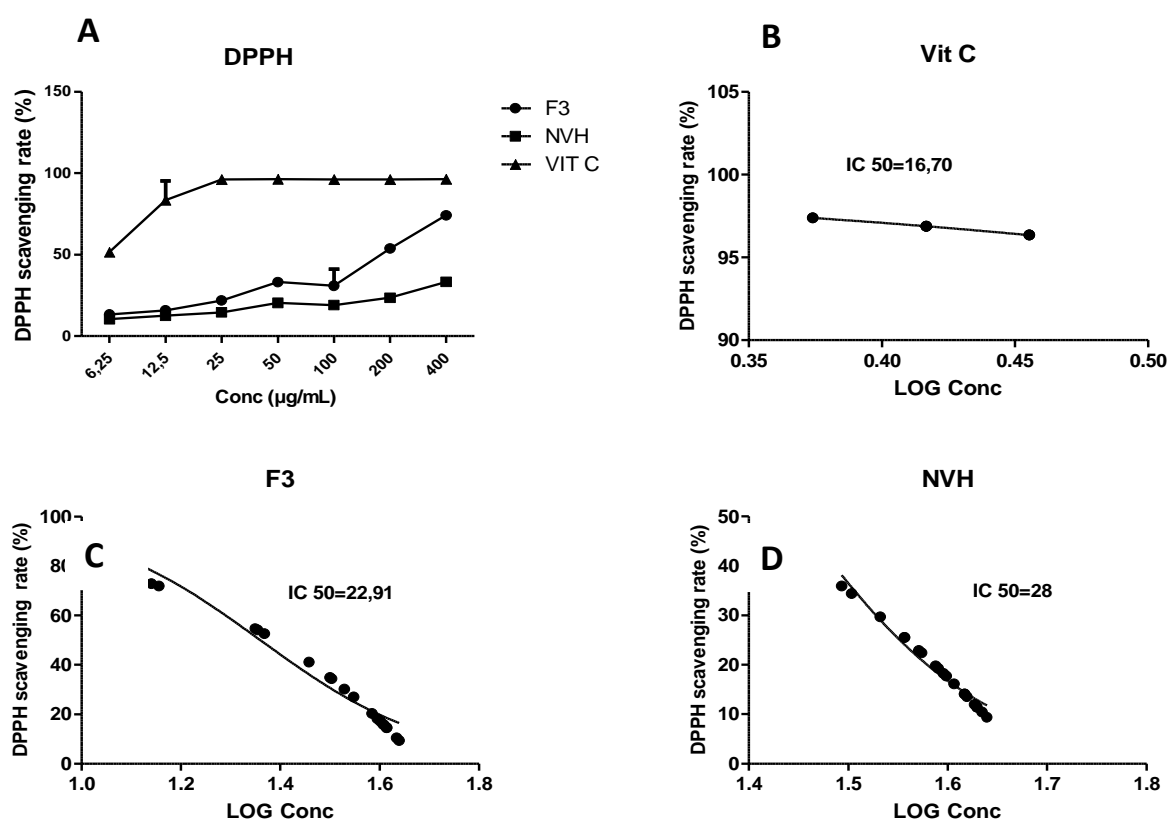


Figure 16 : Capacité anti-radicalaire au DPPH de la fraction F3 de l'extrait aqueux de *N. velutina*

Chaque point représente la moyenne par concentration, n=3

A : pourcentage d'inhibition de la fraction F3 comparé à la vitamine C et à l'extrait aqueux total de *N. velutina*; B, C et D : courbes des IC₅₀ de la fraction F3, de l'extrait total et de la vitamine C; NVH : extrait aqueux de *N. velutina*, VIT C: vitamine C.

III-3-3- Profil de la fraction F3 en Chromatographie Liquide sous Haute Pression

Le profil chromatographique de la fraction F3 révèle la présence de plusieurs composés dans la fraction (Figure 17B). On remarque ainsi l'apparition de groupes de composés minoritaires absorbants à 366 nm entre la 13^{ème} et la 21^{ème} minute et d'autres pics de composés minoritaires absorbants à 366 nm entre la 31^{ème} et la 40^{ème} minute. A partir de la 41^{ème} minute, on remarque une sortie massive de composés indifférenciés absorbants aux 2 longueurs d'onde (254 et 366 nm), à l'exception du pseudo pic de composés majoritaires, sorti à la 49^{ème} minute et de deux autres pics de composés minoritaires, sortis entre la 51^{ème} et la 53^{ème} minute et absorbants uniquement à 366 nm. Comparé à l'extrait aqueux total, on note une similitude entre les composés sortis en masse entre la 40^{ème} et la 55^{ème} minute aux deux longueurs d'onde (Figure 17A).

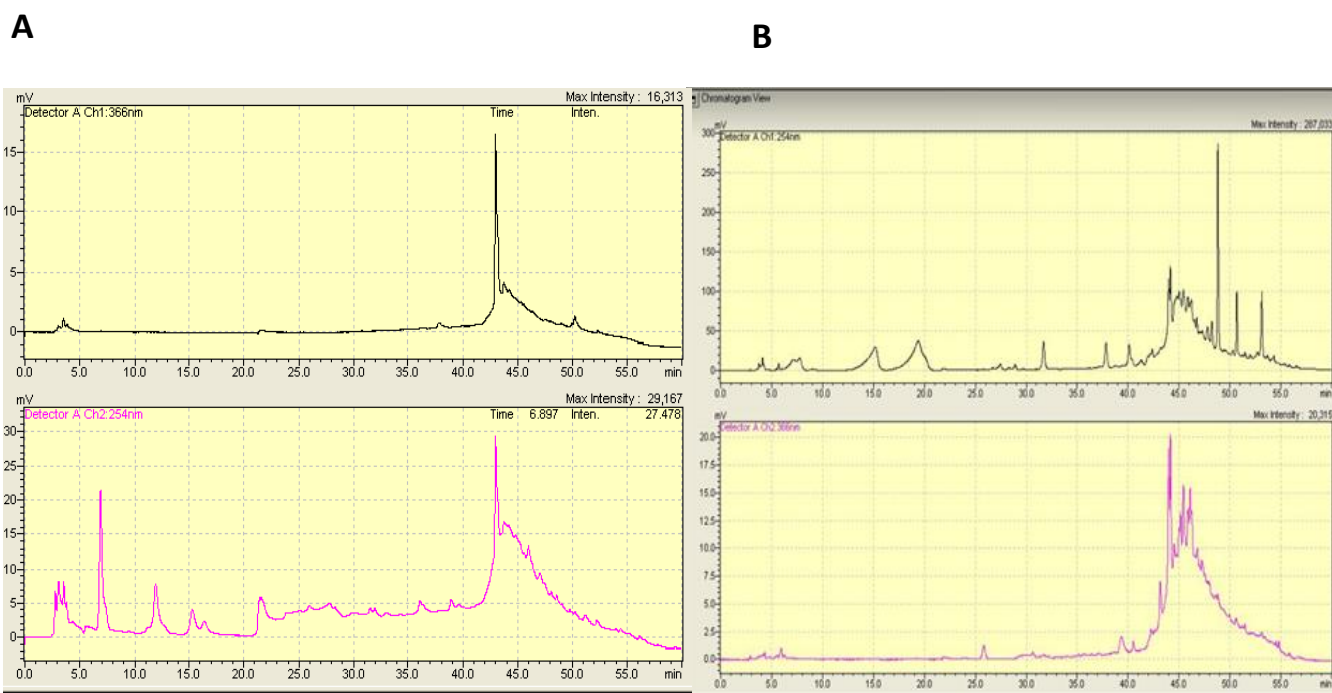


Figure 17 : Profil HPLC de l'extrait aqueux total et de sa fraction F3.

A : Profil de l'extrait aqueux total (NVH), B : Profil de la fraction F3

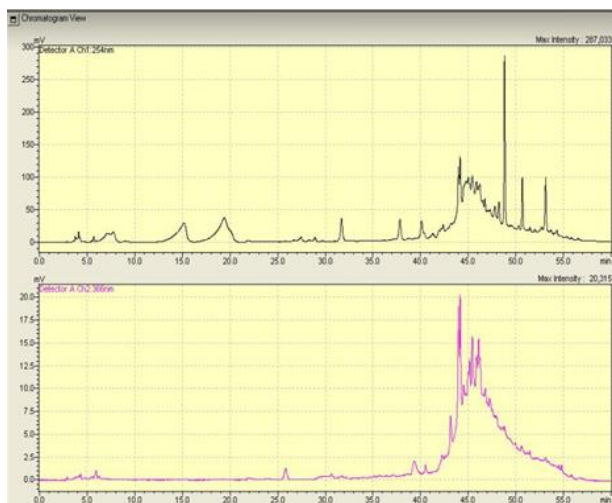
III-3-4- Sous-fractionnement de la fraction F3 par Chromatographie Liquide sous Moyenne Pression (CLMP)

Compte tenu de sa concentration et de son profil chromatographique se rapprochant de celui de l'extrait aqueux total et révélant la présence de plusieurs composés, la fraction F3 a été choisie pour le sous-fractionnement par Chromatographie Liquide sous Moyenne Pression (CLMP). Il a ainsi été isolé, 53 sous-fractions parmi lesquelles 10 sous-fractions d'intérêt. Il s'agit des sous-fractions F3_9, F3_10, F3_12, F3_13, F3_17, F3_18, F3_38, F3_41, F3_52, F3_53.

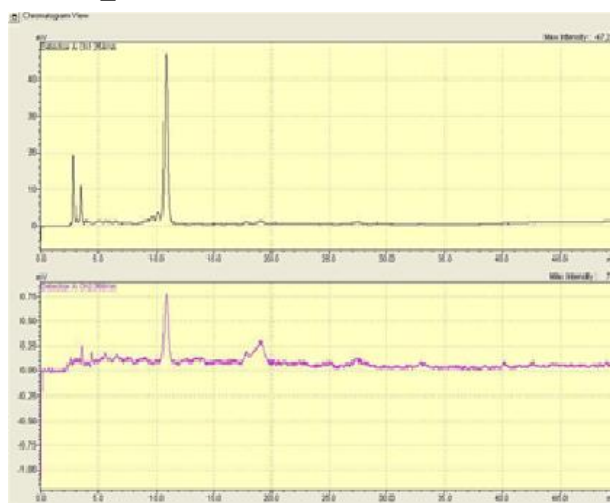
III-3-4-1- Profil chromatographique des sous-fractions d'intérêt

En tenant compte du profil CCM et CLHP, les 10 sous-fractions d'intérêt ont été rassemblées. De ce fait, 5 sous-fractions ont été obtenues. Il s'agit des sous-fractions F3_910, F3_1213, F3_1718, F3_3841 et F3_5253. La figure 18 représente ainsi les profils chromatographiques des fractions rassemblées. On peut y noter, pour la sous-fraction F3_910 un pic sorti à la 10^{ème} minute et absorbant aux deux longueurs d'onde. Pour la sous-fraction F3_1213 le pic est observé entre la 7^{ème} et la 8^{ème} minute et n'absorbe qu'à 366 nm. Les pics des sous-fractions F3_1718 et F3_3841 quant à eux absorbent aux deux longueurs d'onde et sont observés à la 3^{ème} et la 5^{ème} minute respectivement. Tandis que la sous-fraction F3_5253 qui apparaît être la sous-fraction la plus intéressante présente son pic absorbant aux deux longueurs d'onde entre la 14^{ème} et la 15^{ème} minute.

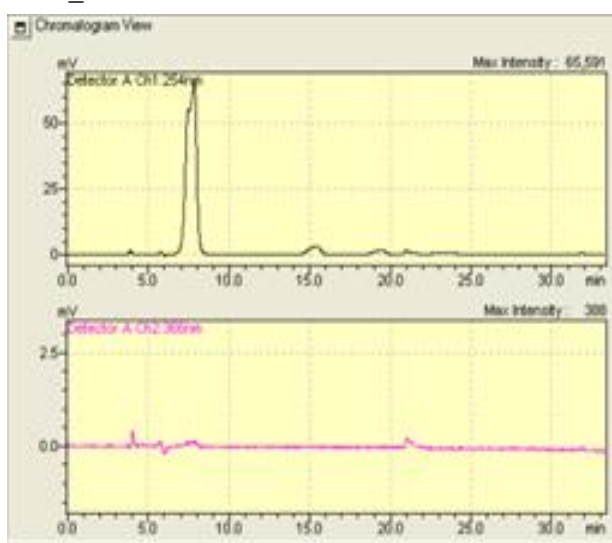
F3



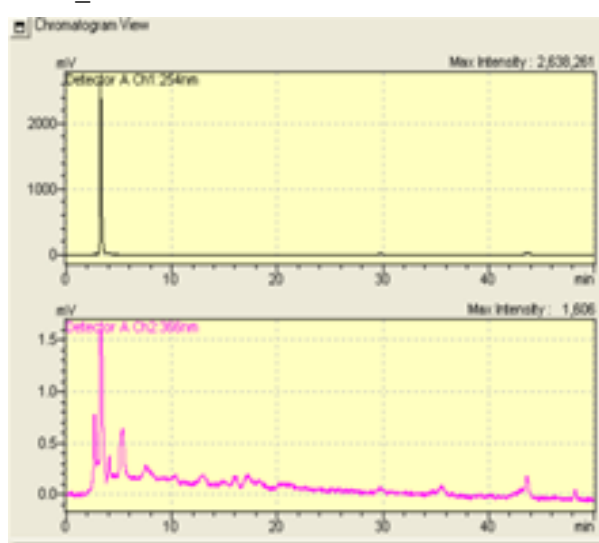
F3_910



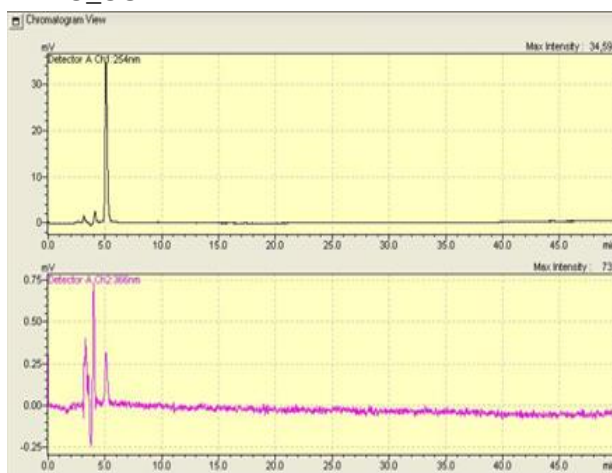
F3_1213



F3_1718



F3_3841



F3_5253

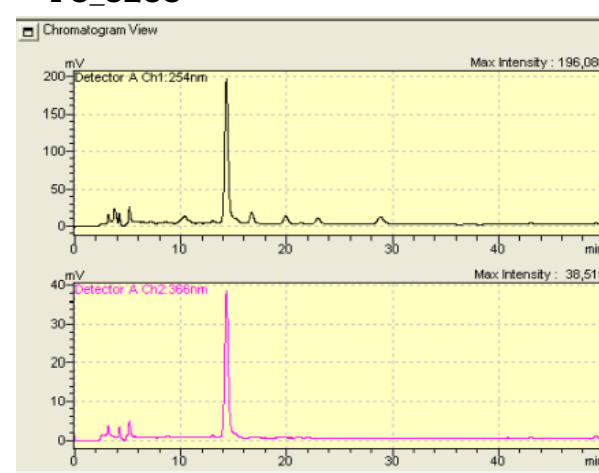


Figure 18 : Profil HPLC des sous-fractions rassemblées de F3

III-3-4-2- Mise en évidence de la sous-fraction à activité anti-radicalaire par Chromatographie sur Couche Mince analytique (CCM)

Afin de mettre en évidence le ou les composé(s) à activité anti-radicalaire, les plaques de CCM des dix sous-fractions de F3 ont été mises au contact du DPPH. Parmi ces dix sous-fractions, seules les sous-fractions F3_52 et F3_53 ont présenté une activité anti-radicalaire au DPPH (Figure 19). La sous-fraction F3_5253 représente ainsi la sous-fraction anti-radicalaire après le rassemblement de F3_52 et F3_53.

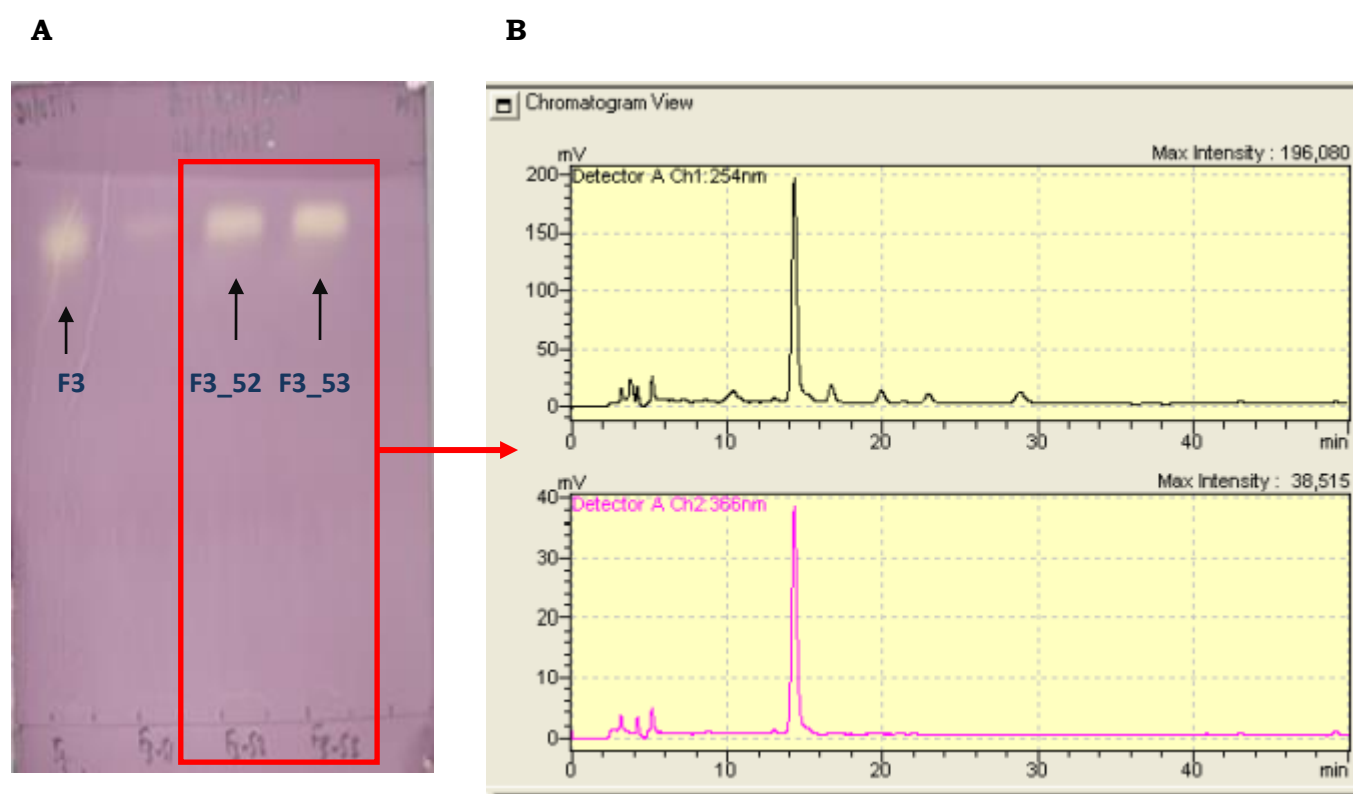


Figure 19 : Profil HPLC et mise en évidence de la sous-fraction anti-radicalaire

A : activité anti-radicalaire au DPPH des sous-fractions F3_52 et F3_53
B : Profil chromatographique de la fraction rassemblée F3_5253

III-4- PROFIL TOXICOLOGIQUE DES EXTRAITS DE *N. VELUTINA*

III-4-1- CYTOTOXICITE

III-4-1-1- Effets des extraits sur les membranes cellulaires

Les effets des extraits de *N. velutina* sur les membranes cellulaires ont été évalués grâce au dosage de la LDH, en comparaison avec le triton. La figure 6, montre une toxicité de l'extrait aqueux, inférieure à 1% (Figure 20A) à différents temps d'incubation et à toutes les concentrations tandis que l'extrait éthanolique (Figure 20B) présente une toxicité maximale de 7,5% environ à la concentration de 1µg/mL, après 24h de traitement à l'extrait. Le triton présente une cytotoxicité max de 100% dès la concentration de 1µg/mL.

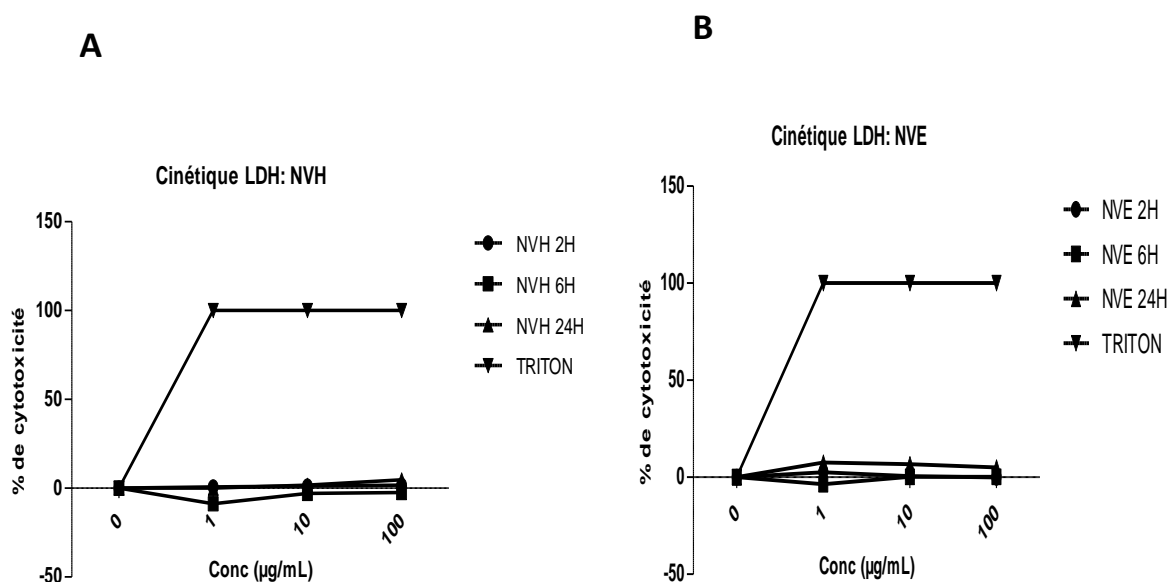


Figure 20 : Effets des extraits de *N. velutina* sur les membranes cellulaires

Chaque point représente la moyenne par concentration ; n=3 ; deux répétitions.

NVH : extrait aqueux de *N. velutina*, NVE : extrait éthanolique de *N. velutina*, LDH : Lactate deshydrogénase

III-4-1-2- Effets des extraits sur la viabilité cellulaire

La figure 21 montre les effets des extraits de *N. velutina* sur la viabilité cellulaire. Il apparaît que les cellules non synchronisées et traitées aux différents extraits pendant 24h (Figure 21A), comparé aux cellules contrôle, présentent un effet antiprolifératif de l'extrait aqueux avec une viabilité cellulaire d'environ 82% à la plus forte concentration (100 µg/mL). La silymarine aux faibles concentrations a induit un effet antiprolifératif (avec 97% de viabilité cellulaire à 1 µg/mL et 92% à 10 µg/mL) alors qu'à la plus forte concentration, elle a provoqué un effet prolifératif (6% de prolifération à 100 µg/mL). Un effet prolifératif de l'extrait éthanolique a été observé à toutes les concentrations, allant jusqu'à 21% de prolifération à 100 µg/mg. Comparé à la silymarine, l'effet antiprolifératif de l'extrait aqueux apparaît plus important.

Sur les cellules synchronisées (Figure 21B, 21C, 21D), un effet antiprolifératif a globalement été noté à différents temps d'incubation et à toutes les concentrations d'extraits et de doxorubicine. Une viabilité cellulaire de 66% a été notée à la plus forte concentration de l'extrait aqueux (100 µg/mL) après 24h de traitement. Une viabilité cellulaire de 70% et 47% a été notée à 100 µg/mL respectivement pour l'extrait éthanolique et la doxorubicine après 24h de traitement. L'effet antiprolifératif de l'extrait aqueux apparaît plus important que celui de l'extrait éthanolique à 3h (52% vs 100% à 100 µg/mL ; Figure 21B) et à 6h (70% vs 79% de viabilité à 100 µg/mL ; Figure 21C). A 24h (Figure 21D) l'effet de l'extrait éthanolique s'avère plus important à partir de la concentration de 0,1 µg/mL. Comparé à la doxorubicine, l'effet de l'extrait aqueux semble plus important aux concentrations inférieures à 1µg/mL après 3h d'incubation (Figure 21B). Mais à 6h (Figure 21C) et 24h (Figure 21D), l'effet de la doxorubicine apparaît plus important aux concentrations de 0,1, 1, et 100 µg/mL.

Après 24h de traitement, sur cellules synchronisées ou non, l'extrait aqueux présente un effet antiprolifératif à toutes les concentrations (avec 82% de viabilité vs 66% de viabilité à 100 µg/mL respectivement sur cellules non synchronisées et cellules synchronisées). Alors que l'extrait éthanolique présente globalement un effet prolifératif sur cellules non synchronisées (21% de prolifération à 100µg/mL) et un effet antiprolifératif sur cellules synchronisées (70% de viabilité à 100µg/mL).

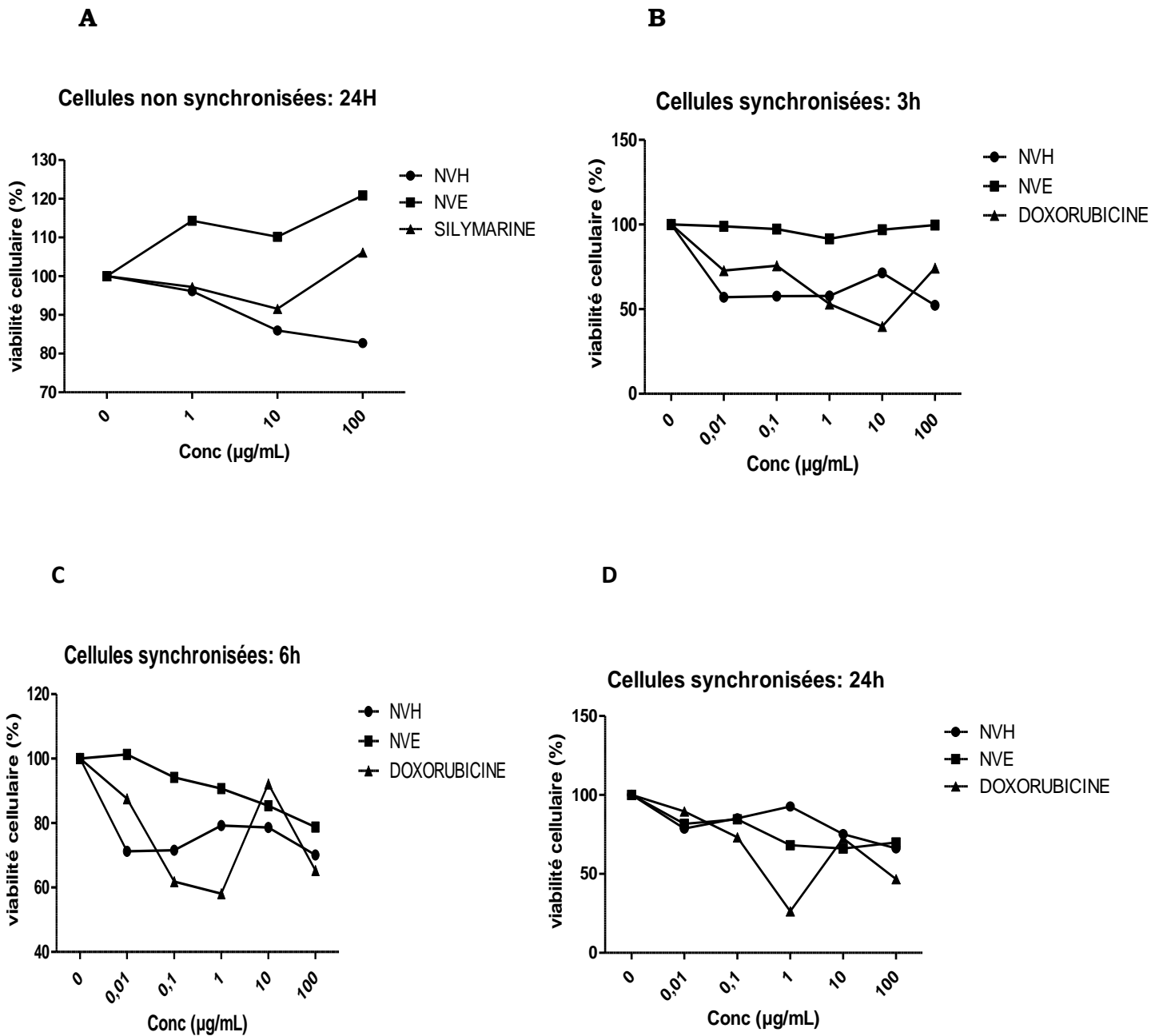


Figure 21 : Effets des extraits de *N. velutina* sur la viabilité cellulaire.

Chaque point représente la moyenne par concentration ; n=3 ; trois répétitions.

A: effets sur cellules non synchronisées, B: effets sur cellules synchronisées et traitées pendant 3H, C: effets sur cellules synchronisées et traitées 6H, D: effets sur cellules synchronisées et traitées pendant 24H, NVH : extrait aqueux de *N. velutina*, NVE : extrait éthanolique de *N. velutina*.

III-4-1-3- Effets des extraits sur l'apoptose cellulaire

La figure 22 présente l'effet des extraits de *N. velutina* sur l'apoptose cellulaire révélée par le test de TUNEL. Cette figure ne révèle aucune activité apoptotique des extraits, quelque soit la concentration d'extrait utilisée.

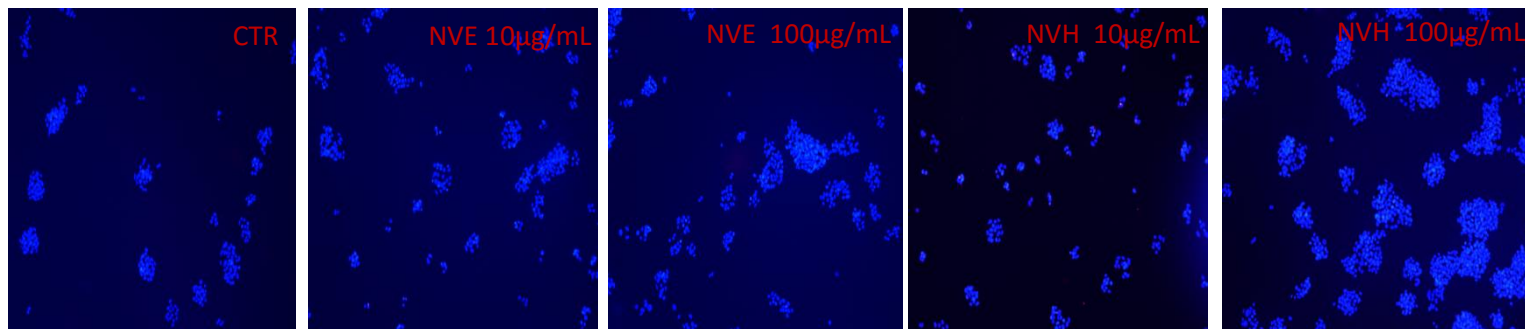


Figure 22 : Effets des extraits de *N. velutina* sur l'apoptose cellulaire

CTR : Contrôle, NVE : extrait éthanolique, NVH : extrait aqueux

III-4-2- TOXICITE AIGUË *IN VIVO* DES EXTRAITS DE *N. VELUTINA*

Dans le but de noter les éventuels signes extérieurs de toxicité, les animaux ont été observés pendant les 2h qui suivaient l'administration des extraits. Les mortalités ont été notées le jour de l'administration (J0), 24h après l'administration (J1), après 24 heures (J2+) et au sacrifice à J7. Dans les deux heures qui suivaient l'administration de l'extrait aqueux, il a été noté une diarrhée chez deux femelles traitées à la dose de 5000 mg/kg. Aucun autre signe de modification du comportement n'a été noté. Vingt et quatre heures après l'administration de l'extrait aqueux, il a été noté une femelle morte à dose de 5000 mg/kg. Aucune autre mortalité n'a été notée jusqu'au sacrifice. Soit un taux de mortalité de 10% dans le groupe de 5000 mg/kg et un taux de mortalité de 3,33%, tous sexes et toutes doses d'extrait aqueux confondus (Tableau XIII).

L'administration de l'extrait éthanolique, n'a entraîné aucune modification du comportement des animaux dans les deux heures qui suivaient l'administration. Cependant, il a été noté plusieurs mortalités dans les 24h (J0 à J1) et après 24h (J2+). Soit un taux de mortalité de 50 et 20% respectivement dans les groupes traités à 500 et 1000 mg/kg. Le taux de mortalité global tous sexes et toutes doses confondus est de 35% chez les animaux traités à l'extrait éthanolique (Tableau XIII).

Tableau XIII : Mortalités observées après administration des extraits de *N. velutina* en toxicité aiguë

			Extrait aqueux (mg/kg)				Extrait éthanolique (mg/kg)			
			0	1000	2000	5000	0	500	1000	
Nombre de morts par groupe	J0	Mâles	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	1 (5)	0 (5)	
		Femelles	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	1 (5)	1 (5)	
	J1	Mâles	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	1 (4)	1 (4)	
		Femelles	0 (5)	0 (5)	0 (5)	1 (5)	0 (5)	1 (4)	0 (4)	
	J2+	Mâles	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	1 (3)	0 (4)	
		Femelles	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (4)	0 (5)	0 (4)	0 (4)	
	Bilan à J7	Mâles	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	3 (5)	1 (5)	
		Femelles	0 (5)	0 (5)	0 (5)	1 (5)	0 (5)	2 (5)	1 (5)	
	Taux de mortalité par groupe (%)			0	0	0	10	0	50	20
	Taux de mortalité global (%)			0	3,33			0	35,00	

Les valeurs dans le tableau représentent le nombre de morts enregistré dans un groupe. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre total d'animaux dans le groupe.

III-4-2-1- EFFETS DES EXTRAITS DE *N. VELUTINA* SUR LE POIDS CORPOREL

- Effets de l'extrait aqueux sur le poids corporel

L'administration de l'extrait aqueux de *N. velutina* aux doses de 1000, 2000 et 5000 mg/kg n'a entraîné aucune variation significative du poids corporel des animaux traités à l'extrait, comparés aux animaux contrôles (Figure 23A). Par contre, dans un même groupe, chez les mâles comme chez les femelles, comparé au jour d'administration de l'extrait (J0), il a été noté une augmentation du poids corporel des animaux, 24h (J1) et 7jours (J7) après administration de l'extrait. Cette augmentation est significative à J1 dans le groupe traité à 1000 mg/kg chez les mâles alors que chez les femelles traitées à 1000 et 5000 mg/kg, l'augmentation du poids corporel est significative à J1 et J7. Dans les groupes contrôles, comparé à J0, on note chez les femelles, une augmentation significative du poids corporel à J1 et J7 alors que chez les mâles, cette augmentation est non significative à J1 (Figure 23B).

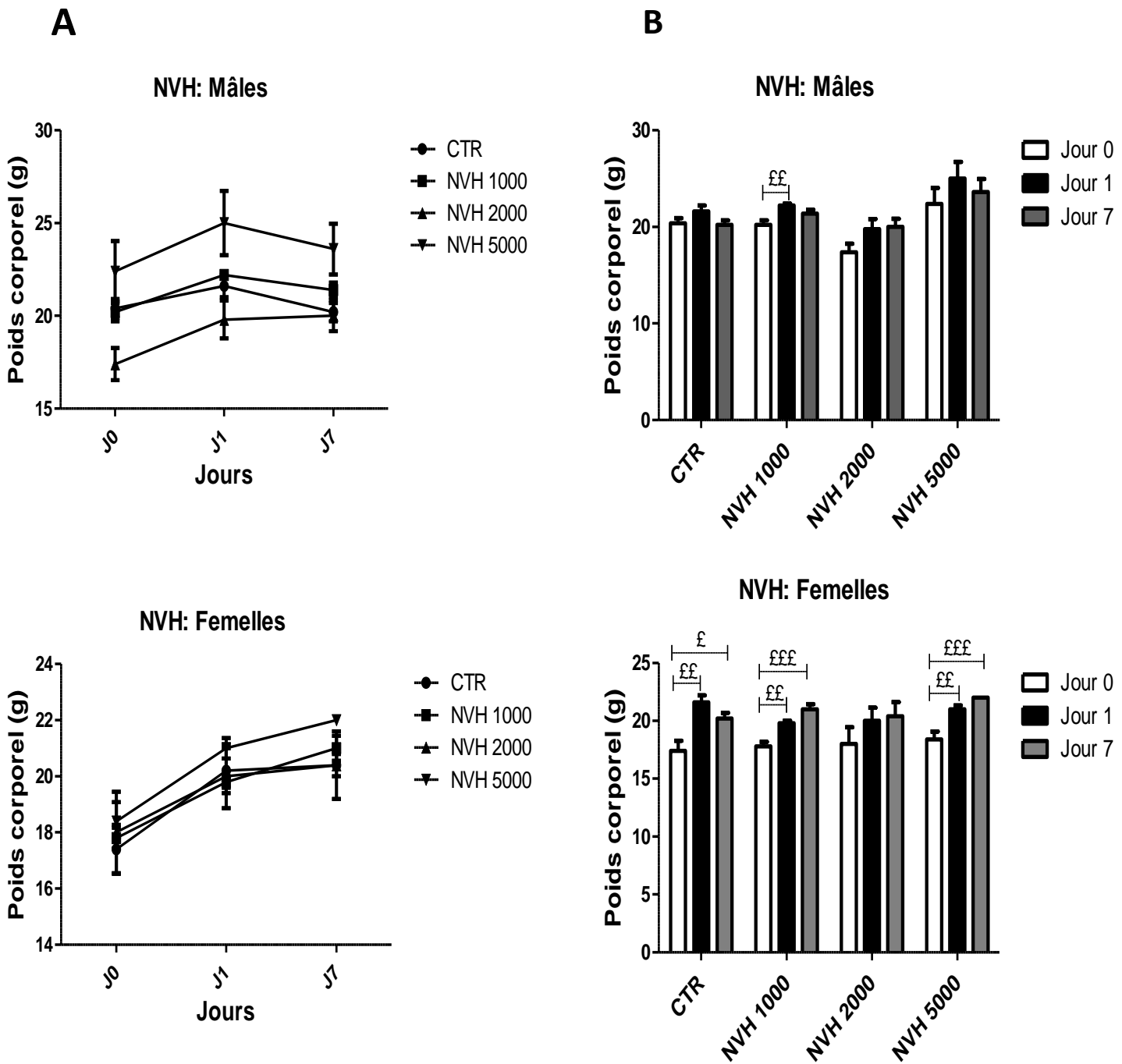


Figure 23 : Effets de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur le poids corporel

A : poids corporel en comparaison intergroupe, B : poids corporel en comparaison intragroupe CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, j0 : jour 0, j1 : jour 1, j7 : jour 7, * : comparaison intergroupe par rapport au contrôle, £ : comparaison intragroupe par rapport à j0, £ p<0,05 ; ££ p<0,01 ; £££ p<0,001.

- Effets de l'extrait éthanolique sur le poids corporel

L'administration de l'extrait éthanolique de *N. velutina* aux doses de 500 et 1000 mg/kg a entraîné à J1, une diminution significative du poids corporel des femelles traitées à 1000 mg/kg, comparées aux femelles contrôles. Chez les femelles traitées à 500 mg/kg et les mâles traités à 500 et 1000 mg/kg, il n'a été observé aucune différence significative, comparés aux animaux contrôles (Figure 24A). Dans un même groupe, en comparaison à J0, il n'a été observé chez les mâles comme chez les femelles aucune variation significative du poids corporel, exception faite chez les mâles traités à la dose de 500 mg/kg où il est noté une diminution significative du poids corporel à J1 et J7 comparés à J0 (Figure 24B).

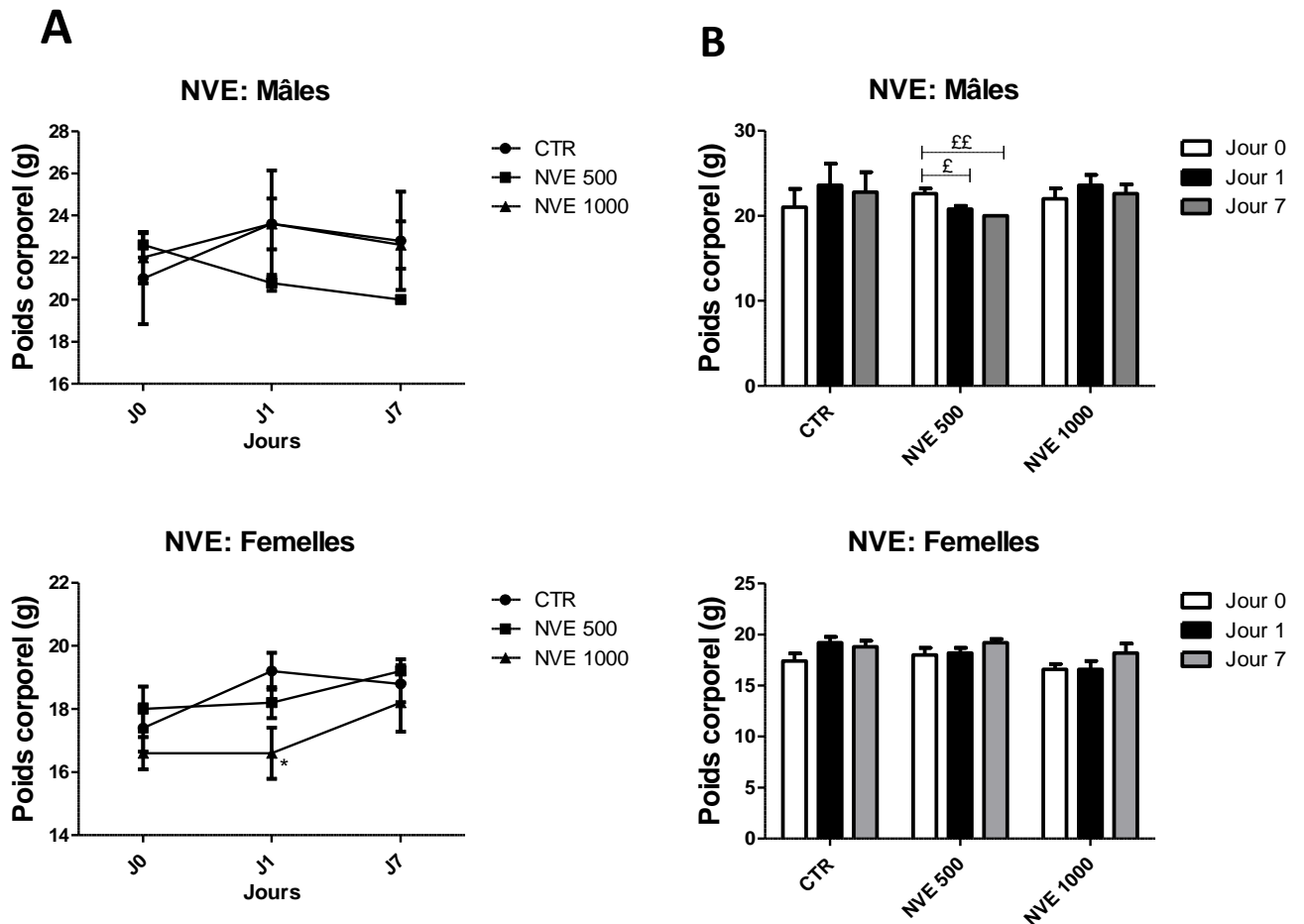


Figure 24 : Effets de l'extrait éthanolique de *N. velutina* sur le poids corporel

A : poids corporel en comparaison intergroupe, B : poids corporel en comparaison intragroupe, CTR : contrôle, NVE : extrait éthanolique, j0 : jour 0, j1 : jour 1, j7 : jour 7, * : comparaison intergroupe par rapport au contrôle, £ : comparaison intragroupe par rapport à j0, * p<0,05, £ p<0,05 ; ££ p<0,01 ; £££ p<0,001.

III-4-2-2- EFFETS DES EXTRAITS DE *N. VELUTINA* SUR LE POIDS RELATIF DES ORGANES

La figure 25 représente les effets des extraits de *N. velutina* sur le poids relatif du foie, des reins, de la rate, du cœur et des poumons. Chez les femelles, il n'y ressort aucune modification significative du poids relatif de ces organes, quelque soit l'extrait administré (Figure 25B, D). Chez les mâles (Figure 25A, C), il n'est noté aucune modification significative du poids des reins, de la rate, du cœur et des poumons, quelque soit l'extrait administré. Par contre, comparé aux contrôles, l'administration de l'extrait aqueux a entraîné une diminution du poids du foie des mâles traités à toutes les doses. Cette diminution (22%) est significative uniquement à la dose de 5000 mg/kg. Chez les mâles traités à l'extrait éthanolique, il a été noté une augmentation (17%) significative du poids du foie à la dose de 500 mg/kg, comparé aux contrôles.

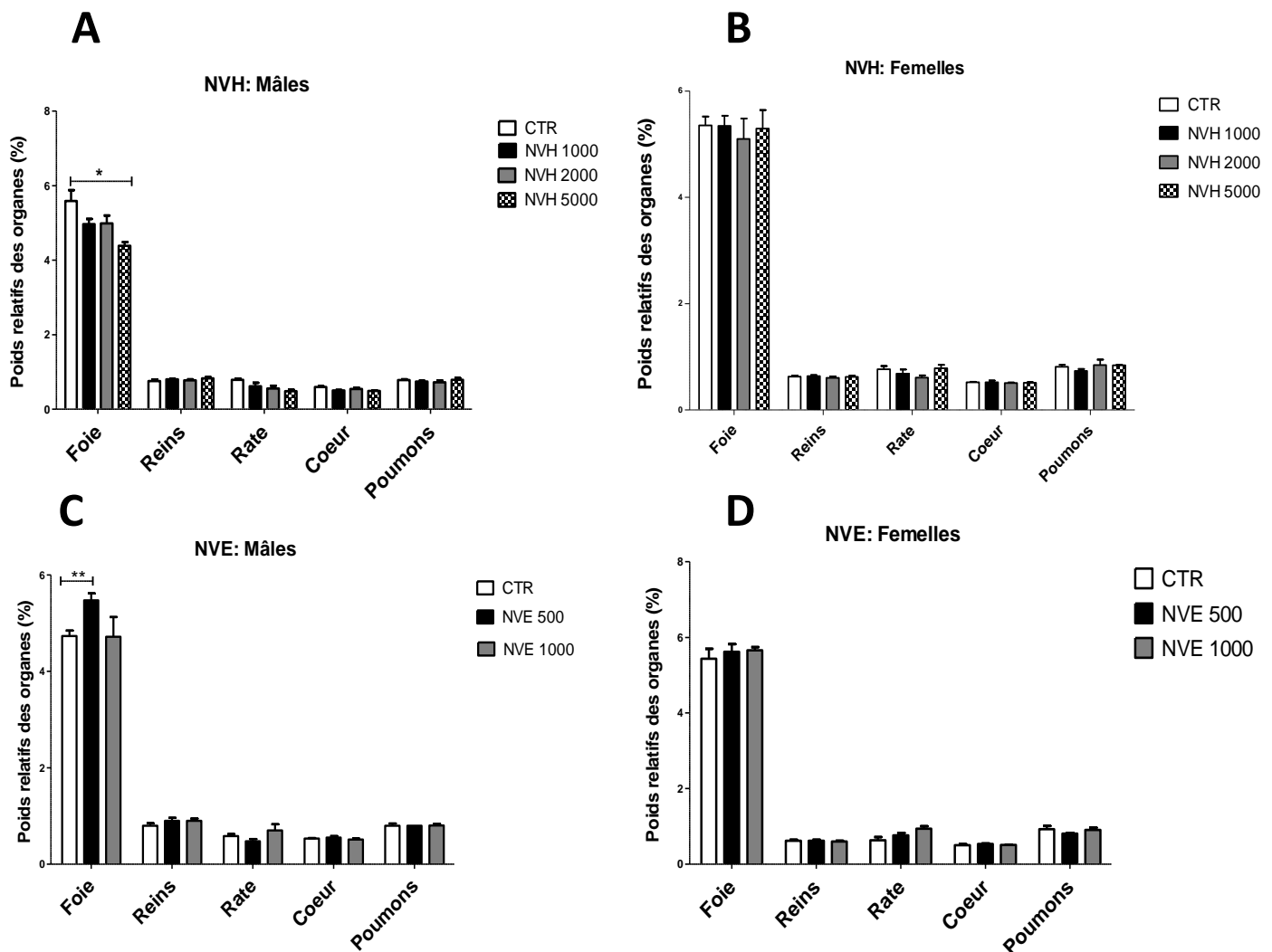


Figure 25 : Effets des extraits de *N. velutina* sur le poids relatif des organes

CTR : contrôle, NVE : extrait éthanolique, NVH : extrait aqueux, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

III-5- EFFETS DES EXTRAITS DE *N. VELUTINA* SUR L'INFLAMMATION HEPATIQUE *IN VITRO*

III-5-1- Effets de l'extrait aqueux sur l'inflammation hépatique *in vitro*

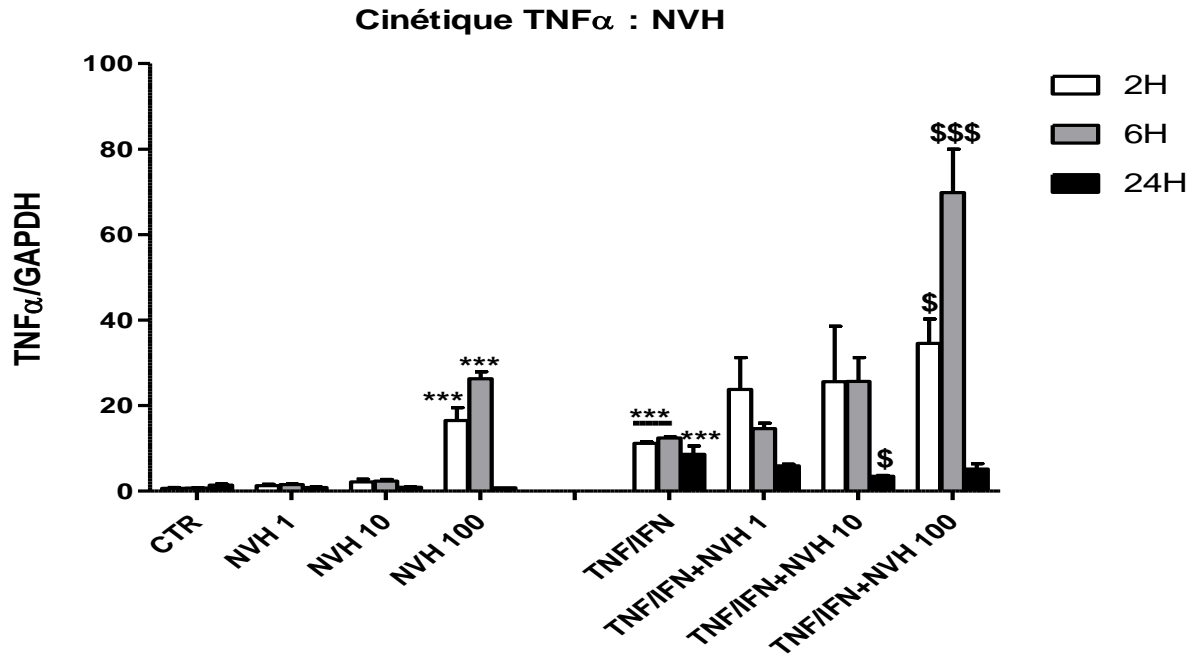
III-5-1-1- Effets en post-traitement sur les cellules HepG2

Afin de déterminer le temps optimal de traitement à l'extrait aqueux de *N. velutina* sur les cellules HepG2, une cinétique du TNF α a été faite. Comparé aux cellules contrôles, les cellules traitées à l'extrait aqueux uniquement, n'ont présentées aucune variation significative de l'expression du TNF α , exception faite à la concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ où il a été observé une augmentation significative de TNF α à 2h ($p < 0,001$; 24 fold) et à 6h ($p < 0,001$; 36 fold) (Figure 26A). La stimulation des cellules aux TNF α /IFN γ a entraîné une augmentation significative de TNF α ($p < 0,001$) à 2h (16 fold), 6h (12 fold) et 24h (6 fold). Comparé au contrôle TNF α /IFN γ , le traitement à l'extrait aqueux pendant 2h et 6h a entraîné, une augmentation de l'expression de TNF α , non significative aux concentrations de 1 et 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mais significative à 2h ($p < 0,05$; 3 fold) et 6h ($p < 0,001$; 6 fold) à la concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 26A). Le traitement à l'extrait aqueux pendant 24h, après stimulation des cellules, a entraîné une diminution de l'expression de TNF α à toutes les concentrations. Cette diminution était significative uniquement à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$; 60%), comparé aux contrôles TNF α /IFN γ (Figure 26B).

Le traitement pendant 24h, à l'extrait aqueux seul, a entraîné une diminution significative ($p < 0,05$) de l'expression de l'IL-8 à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (69%), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (72%) et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (75%), comparé aux cellules contrôles. La stimulation des cellules avec du TNF α /IFN γ a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'expression de IL-8 (2 fold) à 24h, comparé aux cellules contrôles. Le traitement à l'extrait aqueux après stimulation, a entraîné une diminution significative ($p < 0,001$) de l'IL-8 à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (47%), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (64%) et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (45%) (Figure 26B).

En post traitement sur les cellules stimulées, l'extrait aqueux de *N. velutina* présente un effet anti-TNF α après 24h de traitement. Cet effet est accompagné d'une baisse de l'expression de l'IL-8. Le temps optimal de l'effet de l'extrait aqueux de *N. velutina* serait ainsi de 24h, à la concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les concentrations de 1 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ayant présenté des effets anti-TNF α et anti-IL-8 inférieurs à ceux de la concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A



B

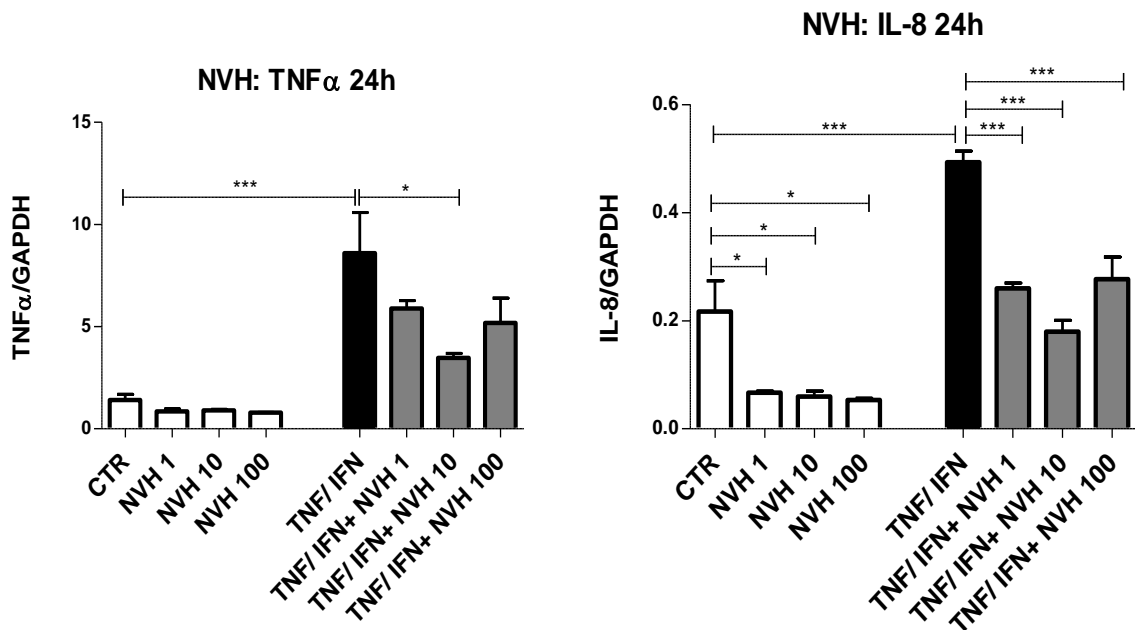


Figure 26 : Effets anti-TNF α et anti-IL8 de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur les cellules HepG2.

A : Cinétique de l'expression de TNF α , B : expression de TNF α et IL-8 à 24h post traitement, CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, TNF α ou TNF : Tumor necrosis factor alpha, IFN γ ou IFN : Interferon gamma, * : Comparaison par rapport au CTR, \$: Comparaison par rapport au TNF α /IFN γ , *p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001, ns : non significatif. Les barres représentent les moyennes \pm ESM.

III-5-1-2- Effets en co-traitement sur les cellules HepG2

Le traitement des cellules uniquement à la silymarine ou à l'extrait aqueux aux concentrations étudiées (1, 10, 50 et 100 µg/mL), n'a pas entraîné une variation significative de l'expression de TNF α , comparé aux cellules contrôles. La stimulation des cellules avec du TNF α /IFN γ uniquement, a entraîné une augmentation significative de l'expression de TNF α ($p < 0,001$; 43 fold), comparé aux cellules contrôles. Le traitement concomitant du TNF α /IFN γ et de l'extrait aqueux a révélé après 24 heures, une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'expression de TNF α aux concentrations de 10 µg/mL (1,6 fold), 50 µg/mL (1,7 fold) et 100 µg/mL (1,4 fold), comparé aux cellules contrôles TNF α /IFN γ . Le traitement concomitant du TNF α /IFN γ et de la silymarine n'a pas entraîné une variation significative de l'expression de TNF α , comparé aux cellules contrôles TNF α /IFN γ (Figure 27).

Après 24h de co-traitement TNF α /IFN γ et extrait aqueux. Il apparaît ainsi un effet pro-TNF α de l'extrait aqueux tandis que la silymarine ne présente aucun effet sur l'expression du TNF α .

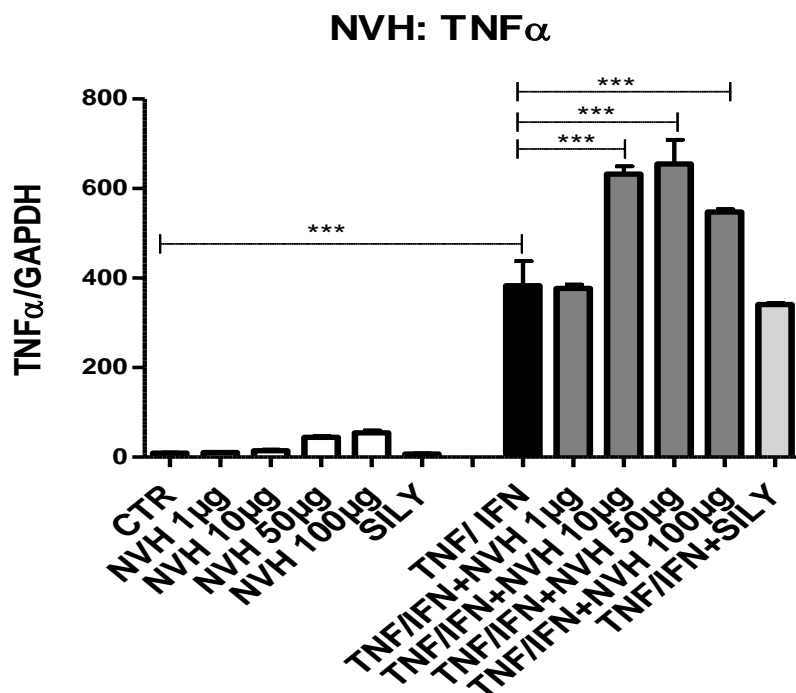


Figure 27 : **Expression de TNF α sur les cellules HepG2 co-traitées avec du TNF α /IFN γ et l'extrait aqueux.**

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, SILY : silymarine, TNF α ou TNF : Tumor necrosis factor alpha, IFN γ ou IFN : Interferon gamma, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns : non significatif. Les barres représentent les moyennes \pm ESM

III-5-1-3- Effets en co-traitement sur les cellules HepaRG

Le traitement des cellules HepaRG uniquement au dexaméthasone ou à l'extrait aqueux aux concentrations étudiées (0,001 ; 0,01 ; 0,1 et 1µg/mL) n'a pas entraîné une variation significative de l'expression de TNF α , NFKappa-b, IL-6 et IL-8, comparé aux cellules contrôles. La stimulation des cellules avec du TNF α /IFN γ a entraîné une augmentation significative de l'expression de TNF α (p<0,001 ; 25 fold), NFKappa-b (p<0,001 ; 4 fold), IL-6 (p<0,001 ; 21 fold) et IL-8 (p<0,01 ; 117 fold), comparé aux cellules contrôles. Comparé aux contrôles stimulés au TNF α /IFN γ , le co-traitement TNF α /IFN γ /extrait a entraîné après 24h, une diminution dose dépendante de l'expression de TNF α et NFKappa-b. Cette diminution significative (p<0,05) à 1µg/mL était de 20% pour TNF α et de 34% pour NFKappa-b. Il n'a été noté aucune différence significative de l'expression de IL-6. Une diminution significative de l'expression de IL-8 (p<0,05 ; 53%) a également été observée à la concentration de 1ng/mL alors qu'aux concentrations de 10 ng/mL, 100 ng/mL et 1µg/mL l'expression de l'IL-8 a augmenté (1,1 ; 1,6 et 1,8 fold respectivement). Cette augmentation était significative (p<0,05) à 100 ng/mL et 1 µg/mL. Le co-traitement TNF α /IFN γ /dexaméthasone a quant à lui entraîné une diminution non significative de NFKappa-b et une diminution significative (p<0,05) de TNF α (18%) et IL-8 (73%). Il n'a été noté aucune différence significative de l'expression de IL-6 (Figure 28).

Comparé au dexaméthasone, l'extrait aqueux de *N. velutina* présente un effet anti-TNF α , anti-NFKb et anti-IL-6. Par contre, cet extrait présente un effet pro-IL-8 tandis que le dexaméthasone est anti-TNF α , anti-NFKb anti-IL-6 et anti-IL-8. Le co-traitement TNF α /IFN γ /extrait aqueux présente une tendance anti-inflammatoire sur les cellules HepaRG différenciées en hépatocytes.

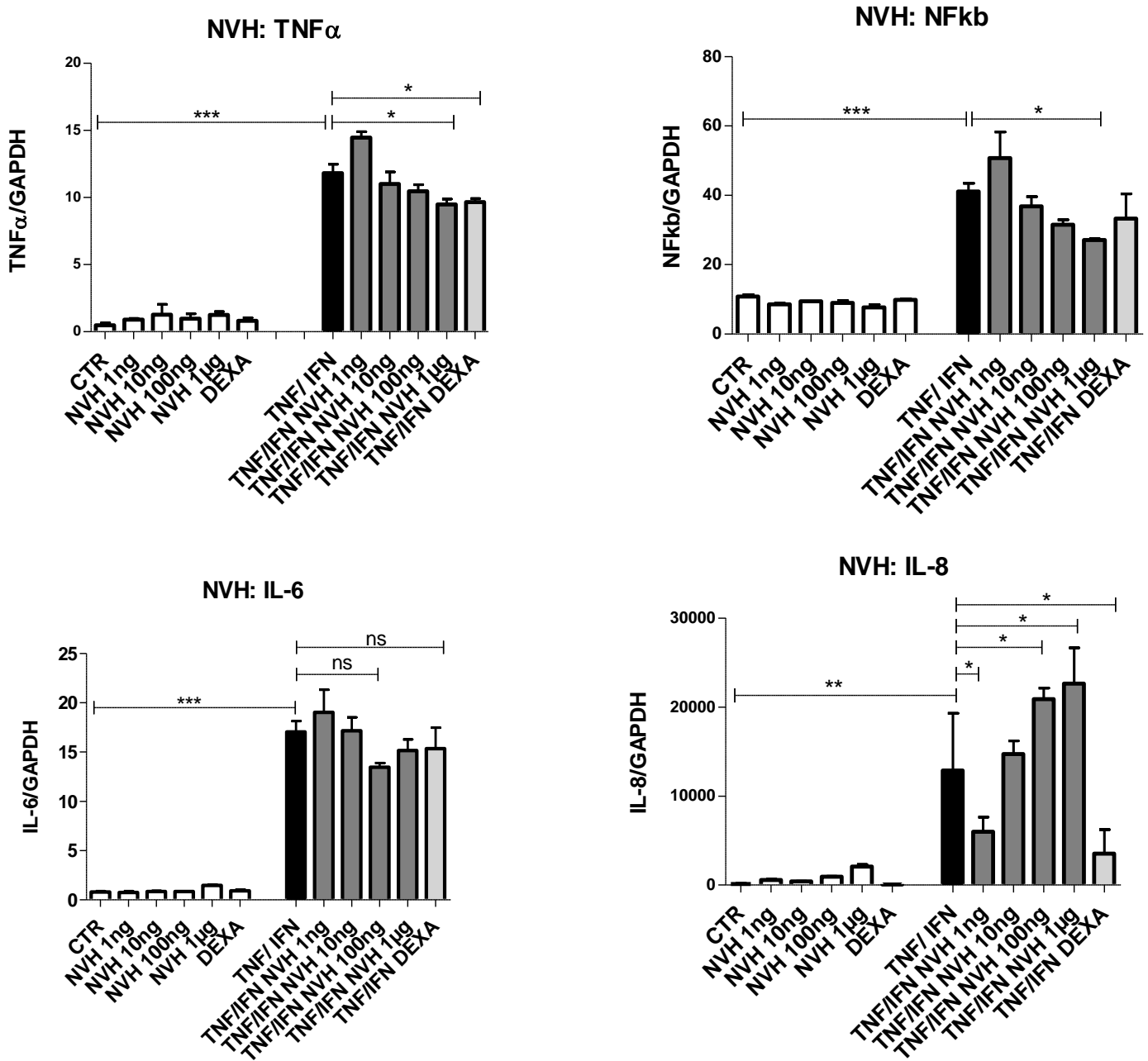


Figure 28 : Effets anti-inflammatoires hépatiques de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur les cellules HepaRG

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, DEXA : dexaméthasone, TNF α ou TNF : Tumor necrosis factor alpha, IFN γ ou IFN : Interferon gamma, NF κ b : Nuclear Factor Kappa b ; IL-6 : Interleukine 6, IL-8 : Interleukine 8 ; *p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001, ns : non significatif. Les barres représentent les moyennes \pm ESM

III-5-2- Effets de l'extrait éthanolique sur l'inflammation hépatique *in vitro*

III-5-2-1- Effets en post-traitement sur les cellules HepG2

Le traitement des cellules uniquement à l'extrait éthanolique a révélé comparé aux cellules contrôles, une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'expression de $TNF\alpha$ à 2h aux concentrations de 1 $\mu\text{g/mL}$ (184 fold), 10 $\mu\text{g/mL}$ (122 fold) et 100 $\mu\text{g/mL}$ (259 fold), à 6h aux concentrations de 1 $\mu\text{g/mL}$ (201 fold), 10 $\mu\text{g/mL}$ (228 fold) et 100 $\mu\text{g/mL}$ (448 fold) et à 24h aux concentrations de 1 $\mu\text{g/mL}$ (29 fold) et 10 $\mu\text{g/mL}$ (14 fold). La stimulation des cellules avec du $TNF\alpha/IFN\gamma$ a entraîné comparé aux cellules contrôles, une augmentation non significative de l'expression de $TNF\alpha$ à tous les temps. Comparées aux cellules contrôles stimulées, les cellules stimulées puis traitées à l'extrait éthanolique ont présenté une augmentation significative de l'expression de $TNF\alpha$ à 2h aux concentrations de 1 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$; 9 fold), 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$; 7 fold) et 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$; 12 fold), à 6h à la concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$; 34 fold) et à 24h à la concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$; 5 fold) (Figure 29).

Le traitement à l'extrait éthanolique aurait ainsi un effet pro- $TNF\alpha$ quelque soit la durée du traitement et l'état stimulé ou non des cellules.

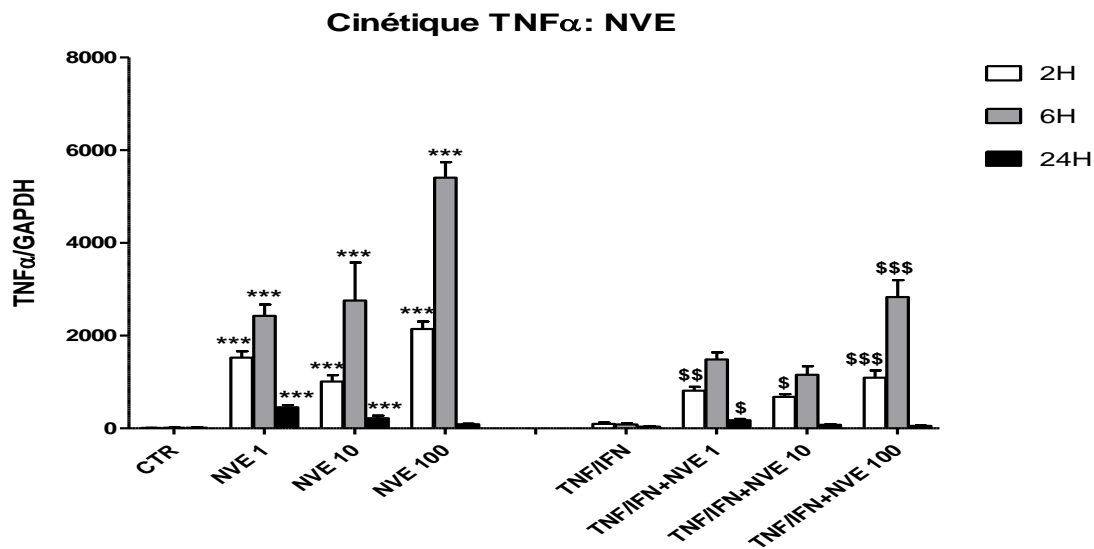


Figure 29 : Effets de l'extrait éthanolique de *N. velutina* en post-traitement sur les cellules HepG2

CTR : contrôle, NVE : extrait éthanolique, $TNF\alpha$ ou TNF : Tumor necrosis factor alpha, $IFN\gamma$ ou IFN : Interferon gamma, * : Comparaison par rapport au CTR, \$: Comparaison par rapport au $TNF\alpha/IFN\gamma$, * ou \$: $p < 0,05$; ** ou \$\$: $p < 0,01$; *** ou \$\$\$: $p < 0,001$, ns : non significatif. Les barres représentent les moyennes \pm ESM

III-5-2-2- Effets en co-traitement sur les cellules HepG2

La figure 30 montre les effets de l'extrait éthanolique de *N. velutina* en co-traitement sur les cellules HepG2. Il y ressort, comparé aux cellules contrôles, une augmentation de l'expression de TNF α chez les cellules traitées uniquement à l'extrait éthanolique aux concentrations de 1, 10 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cette augmentation est significative ($p < 0,01$) à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (33 fold). Il n'a été noté aucune variation significative de l'expression de TNF α chez les cellules traitées uniquement à l'extrait éthanolique à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La stimulation des cellules aux TNF α /IFN γ a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) de TNF α (43 fold), comparé aux cellules contrôles. Le traitement concomitant du TNF α /IFN γ et de l'extrait éthanolique a entraîné une augmentation de l'expression de TNF α aux concentrations de 1, 10 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, comparé aux contrôles stimulés. Cette augmentation est significative ($p < 0,001$) à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2,3 fold). Par contre à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, le traitement concomitant du TNF α /IFN γ et de l'extrait éthanolique a entraîné une diminution significative de l'expression de TNF α ($p < 0,001$; 83 %). Le traitement des cellules à la silymarine uniquement n'a entraîné aucune variation significative de l'expression de TNF α , comparé aux cellules contrôles. De même, aucune variation significative n'a été observée après le co-traitement TNF α /IFN γ /silymarine, comparé aux cellules contrôles stimulées.

Le co-traitement TNF α /IFN γ /extrait éthanolique pendant 24h entraînerait ainsi un effet antiTNF α de l'extrait à la concentration de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La silymarine quant à elle ne présente aucun effet antiTNF α à la concentration étudiée (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

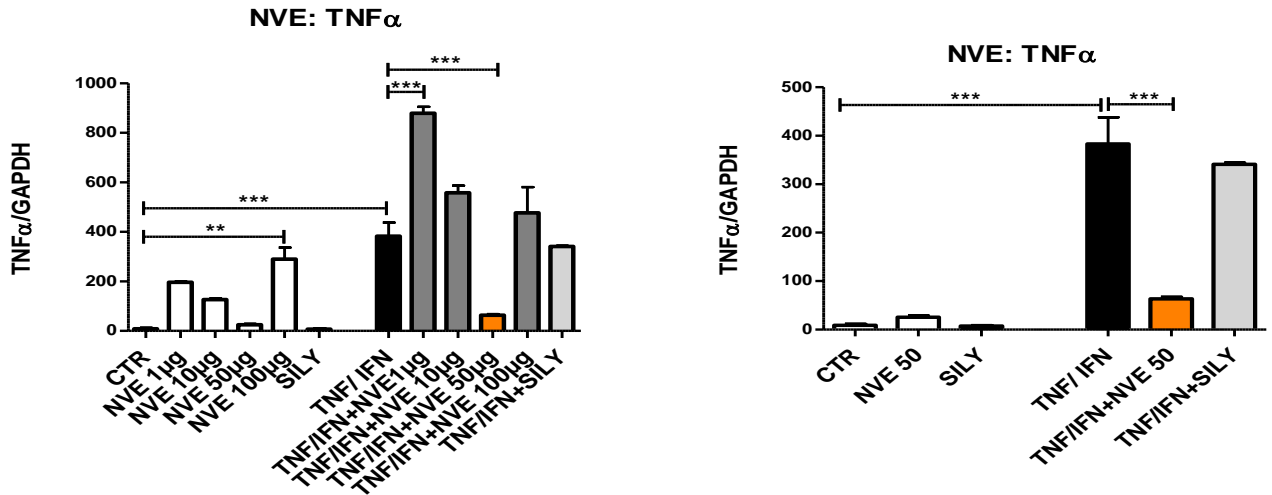


Figure 30 : Effets de l'extrait éthanologique de *N. velutina* en co-traitement sur les cellules HepG2

CTR : contrôle, NVE : extrait éthanologique, TNF α : Tumor necrosis factor alpha, IFN γ : Interféron gamma, SILY : silymarine, *p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001, ns : non significatif
Les barres représentent les moyennes \pm ESM

III-6- EFFETS DES EXTRAITS DE *N. VELUTINA* SUR L'HEPATITE AIGUË INDUITE PAR LE TETRACHLORURE DE CARBONE (CCl₄)

Afin d'étudier les effets des extraits aqueux et éthanologique de *N. velutina* sur l'hépatite aiguë induite par le CCl₄, plusieurs paramètres ont été évalués chez les souris C57BL/6 et les souris BALB/C.

III-6-1- Effets d'une dose unique de l'extrait aqueux chez les C57BL/6

III-6-1-1- Sur les transaminases sériques

La figure 31 montre les effets de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur les transaminases sériques suite à l'administration d'une dose unique. Il y ressort que le traitement des animaux uniquement à l'extrait aqueux (75 et 150 mg/kg), n'a entraîné aucune variation significative de la quantité des transaminases sériques, en comparaison au groupe contrôle. Après induction de l'hépatite aiguë, il est noté une augmentation significative (p<0,01) de l'ASAT (42 fold) et de l'ALAT (238 fold). Le traitement concomitant du CCl₄ et de l'extrait, a entraîné une diminution significative des transaminases (p<0,05) chez les animaux traités à la plus petite

dose d'extrait (75 mg/kg). Soit 35 % et 32 % de diminution respectivement pour l'ASAT et l'ALAT.

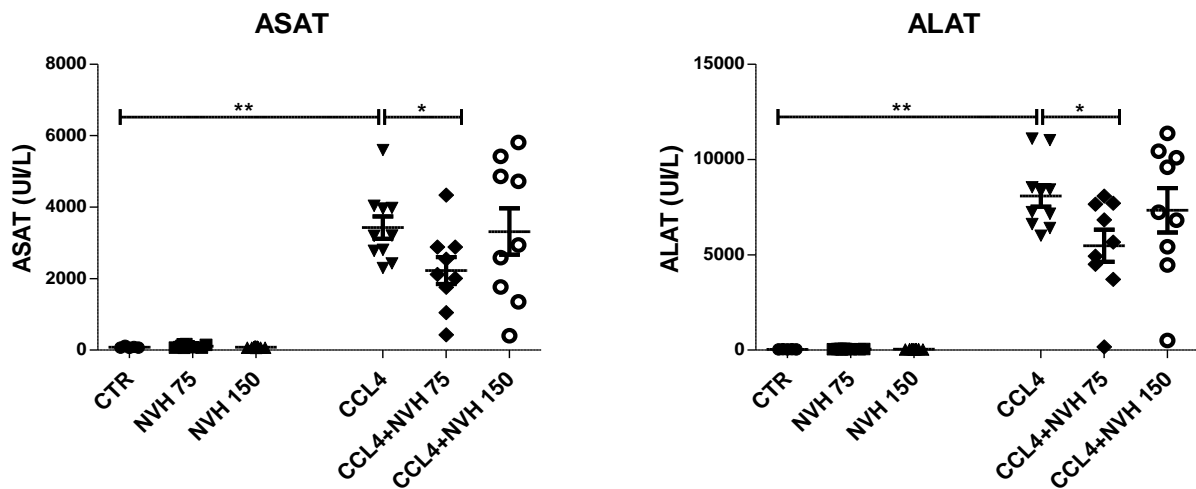


Figure 31 : Effets d'une dose unique de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur les transaminases sériques

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, *p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; n≥5 ; Les barres entre les points représentent les ESM. Chaque point sur le graphique représente la valeur pour un animal

III-6-1-2- Sur l'expression de quelques cytokines pro-inflammatoires, de l'iNOS et COX-2

Les effets de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur l'expression de TNF α , IL-1 β , iNOS, COX-2 et IL-6 sont représentés sur la figure 32. Il n'y ressort aucune variation significative de l'expression de TNF α , IL-1 β , iNOS et COX-2, chez les animaux traités à l'extrait aqueux uniquement, comparé aux contrôles. Par contre, il est noté une augmentation non significative de l'expression de IL-6. Après induction de l'hépatite aiguë, il a été observé une augmentation significative de TNF α (p<0,001 ; 5 fold), IL-1 β (p<0,01 ; 2 fold), iNOS (p<0,001 ; 5 fold), COX-2 (p<0,01 ; 72 fold) et IL-6 (p<0,05 ; 2 fold), comparé aux contrôles. Le traitement concomitant du CCl₄ et de l'extrait aqueux a entraîné une diminution non significative de TNF α , iNOS et COX-2 à toutes les doses. L'expression de IL-1 β et IL-6 a par contre diminuée significativement (p<0,05) à la plus forte dose (150 mg/kg). Soit 33% et 54% de diminution respectivement pour IL-1 β et IL-6.

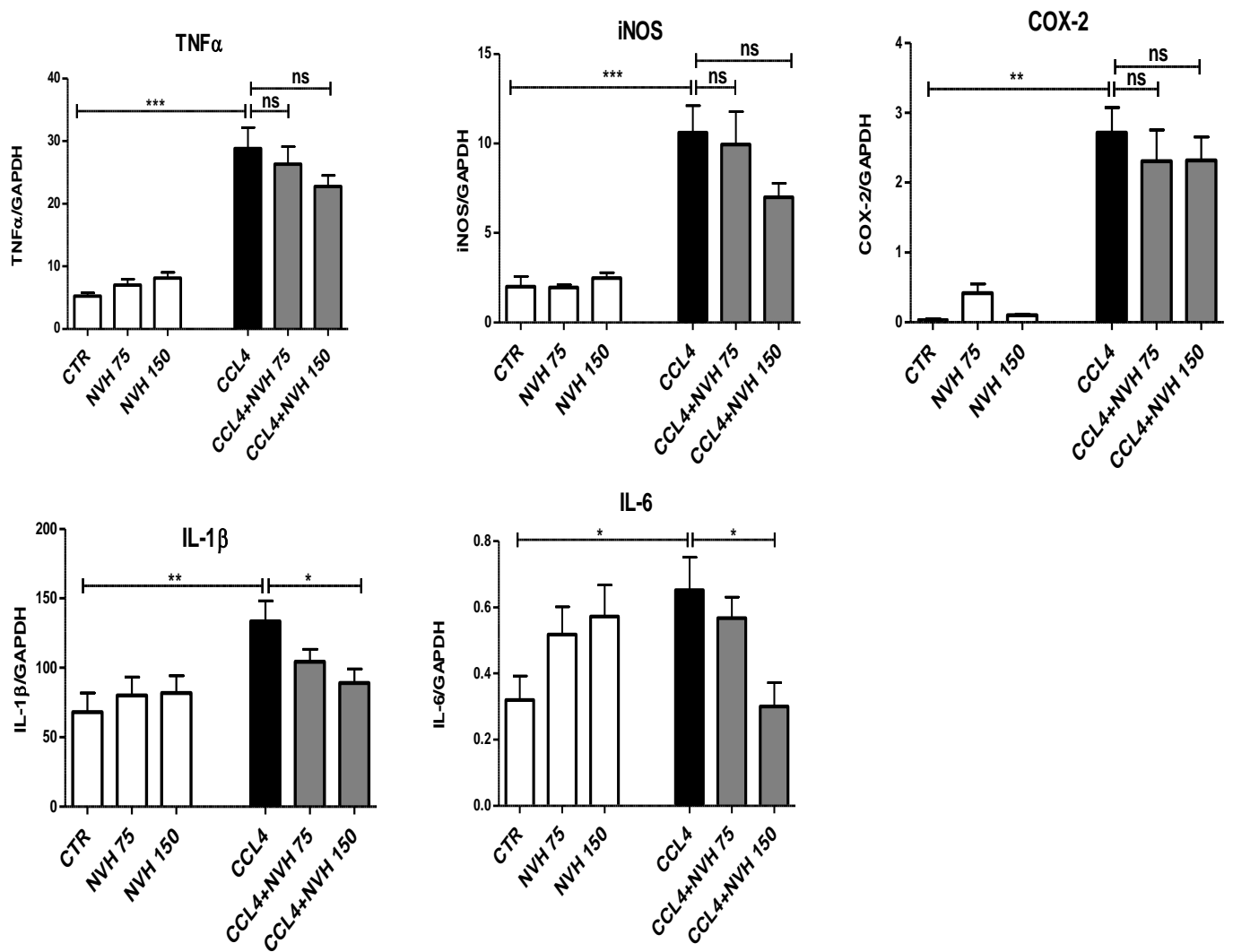


Figure 32 : Effets d'une dose unique de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur l'expression de TNF α , IL-1 β , iNOS, COX-2 et IL-6.

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha, IL-1 β : Interleukine 1 beta, iNOS : inducible Nitrite Oxydase Synthetase COX-2 : Cyclooxygénase 2, IL-6 : Interleukine 6, *p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001, ns : non significatif ; n \geq 5 ; Les barres représentent les moyennes \pm ESM.

III-6-1-3- Sur les lésions hépatiques induites par le CCl₄

La figure 33 présente l'effet d'une dose unique de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur les lésions hépatiques induites par le CCl₄. Vingt et quatre heures après le traitement à l'extrait aqueux, en comparaison aux animaux contrôles, il n'a été noté aucune réparation des lésions causées par le CCl₄.

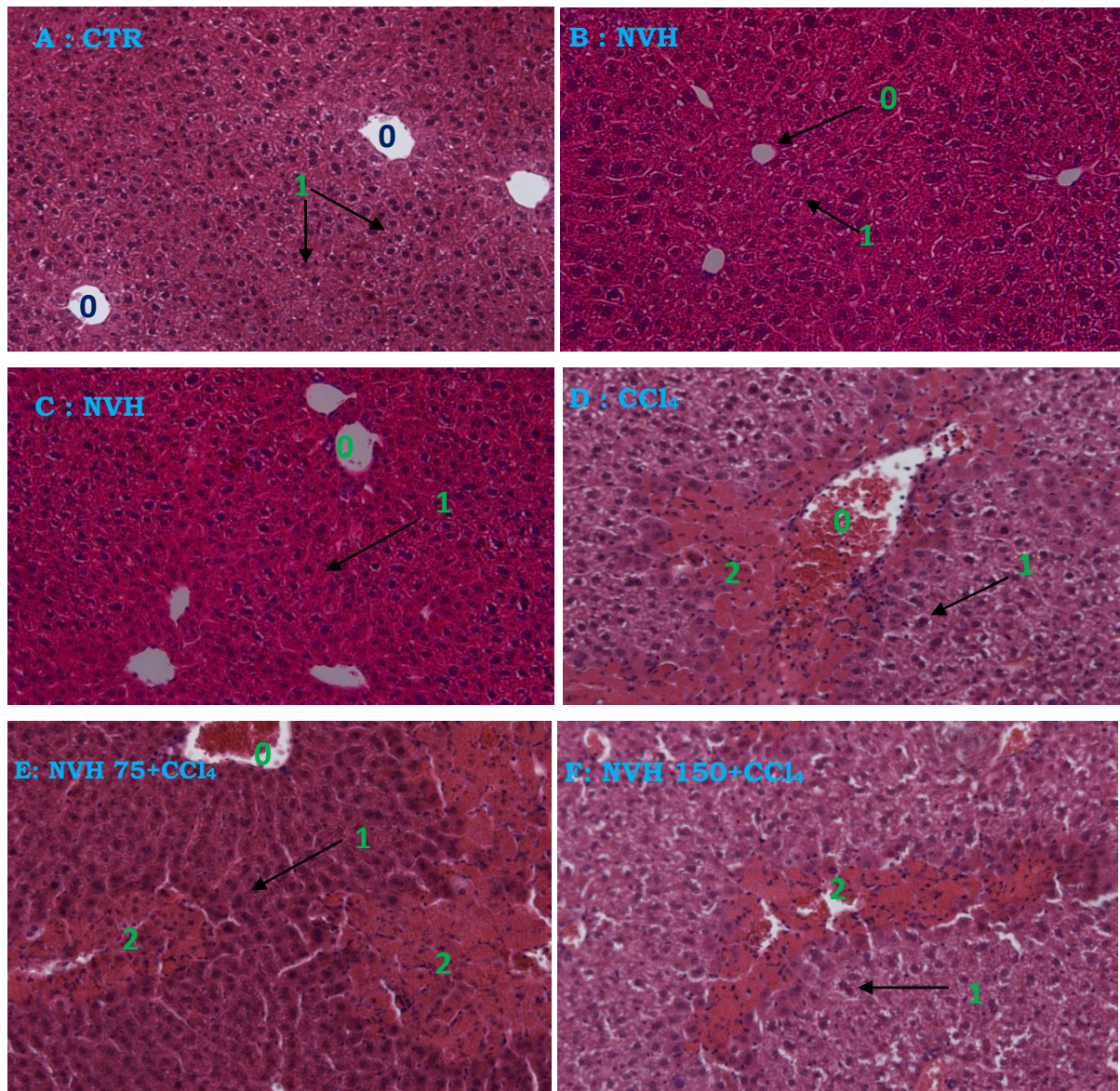


Figure 33 : Effets d'une dose unique de l'extrait aqueux sur les lésions hépatiques induites par le CCl₄ (HE x100)

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone. A : Foie d'une souris contrôle avec une structure normale : veines centrolobulaires (0) Hépatocytes (1) ; B et C : Foie des souris traitées uniquement à l'extrait aqueux à 75mg/kg (B) et 150 mg/kg (C) : structure normale ; D : Foie d'une souris intoxiquée au CCl₄ : présence des lésions nécrotiques (2) ; E et F : Foie des souris intoxiquées au CCl₄ puis traitées à l'extrait aqueux à 75 mg/kg (E) et 150 mg/kg (F) : présence des lésions nécrotiques (2).

III-6-1-4- Sur l'expression de quelques chimiokines et le récepteur CXCR-2

Les effets d'une dose unique de l'extrait aqueux ont été évalués sur le récepteur CXCR-2 et les chimiokines CXCL-1/KC, CXCL-2/MIP-2, CXCL-5/LIX. L'administration de l'extrait aqueux uniquement n'a entraîné aucune variation significative de l'expression de ces différentes chimiokines et du récepteur CXCR-2, comparé aux contrôles. L'induction de l'hépatite aiguë au CCl₄ a provoqué après 24h, une augmentation significative de CXCR-2 ($p < 0,001$; 70 fold), CXCL-1/KC ($p < 0,01$; 4 fold), CXCL-2/MIP-2 ($p < 0,001$; 11 fold) et CXCL-5/LIX ($p < 0,001$; 13 fold), comparé aux contrôles. Comparé au groupe CCl₄, le traitement concomitant du CCl₄ et de l'extrait aqueux a entraîné une diminution non significative de l'expression de CXCL-2/MIP-2, une diminution significative de CXCR-2 ($p < 0,01$; 47%) à la dose de 75 mg/kg et une diminution significative ($p < 0,05$) de CXCL-1/KC (49%) et CXCL-5/LIX (71%) à la dose de 150 mg/kg (Figure 34).

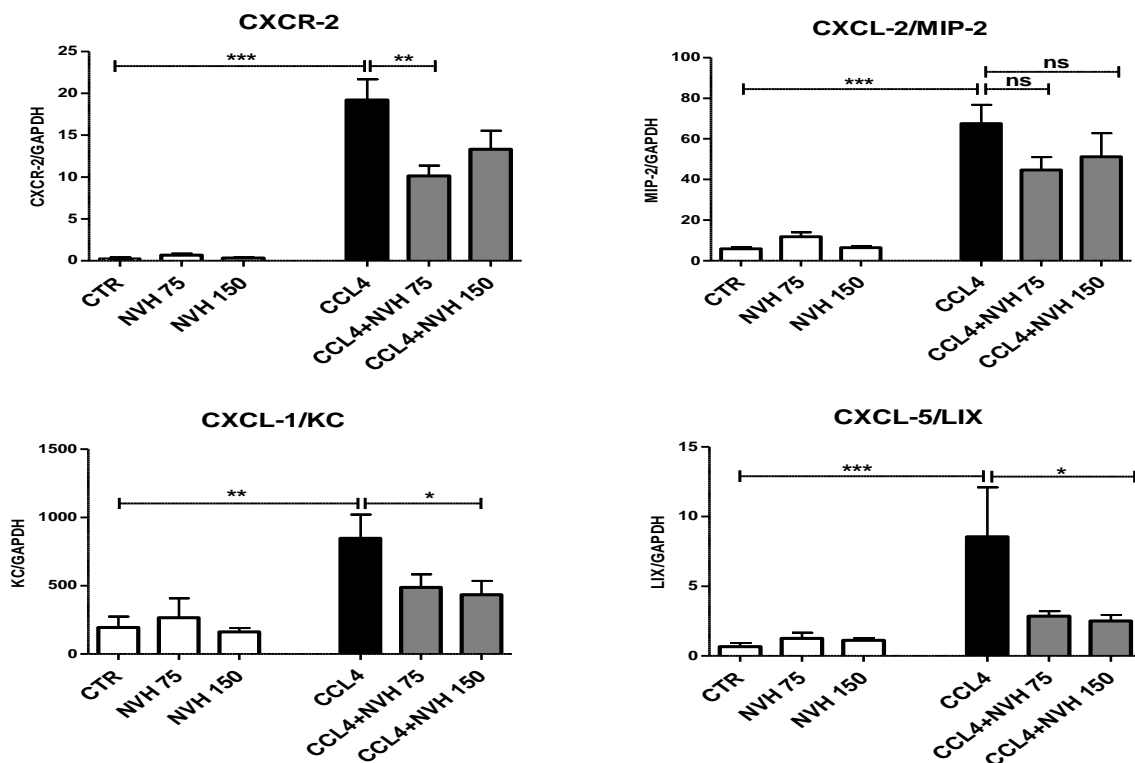


Figure 34 : Effets d'une dose unique de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur l'expression de quelques chimiokines et le récepteur CXCR-2.

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, CXCL-1/KC : ligand 1 de la famille des chimiokines CXC, CXCL-2/MIP-2 : Ligand 2 de la famille CXC/Macrophage Inhibitory Protein, CXCL-5/LIX : Ligand 5 de la famille CXC, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns : non significatif ; $n \geq 5$. Les barres représentent les moyennes \pm ESM

III-6-1-5- Sur l'expression de quelques antioxydants : CATALASE, GPX-1, SOD-1 et SOD-3.

Dans le but d'évaluer *in vivo* les effets antioxydants d'une dose unique de l'extrait aqueux de *N. velutina*, l'expression de la catalase (CAT), du glutathion peroxydase 1 (GPX-1), des Superoxydes dismutases 1 et 3 (SOD-1 et SOD-3) a été évaluée. Le traitement à l'extrait aqueux uniquement n'a pas entraîné de variation significative de l'expression de la CAT, du GPX-1 et des SOD-1 et 3, comparé au groupe contrôle. L'induction de l'hépatite aiguë au CCl₄ a entraîné après 24h, une diminution significative de l'expression de la catalase ($p < 0,001$; 48%) et du GPX-1 ($p < 0,05$; 23%) et une augmentation significative de la SOD-3 ($p < 0,001$; 1,7 fold), comparé aux contrôles. Le traitement à l'extrait aqueux n'a pas entraîné une variation significative de l'expression de la CAT, du GPX-1 et de la SOD-3, comparé au groupe CCl₄. Il n'a été noté aucune modification significative de l'expression de la SOD-1 entre les différents groupes (Figure 35).

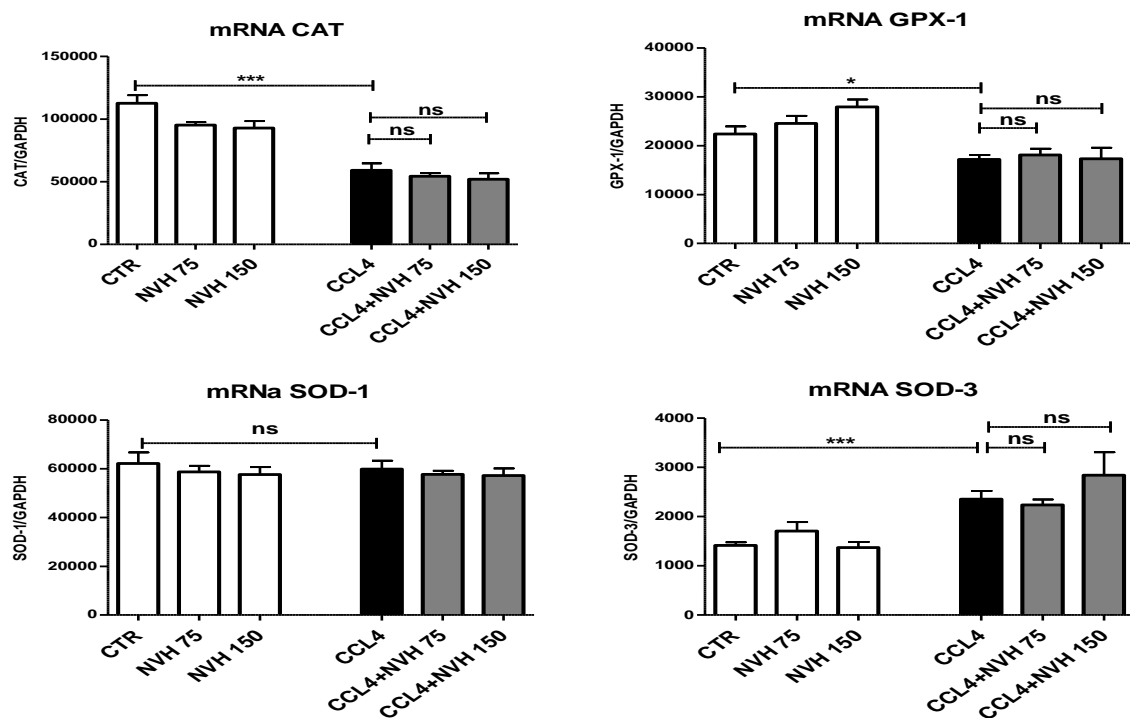


Figure 35 : Effets d'une dose unique de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur l'expression de la catalase, le GPX-1, la SOD-1 et la SOD-3.

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, CAT : catalase, GPX-1 : Glutathion peroxydase, SOD-1 : Superoxyde dismutase 1, SOD-3 : Superoxyde dismutase 3, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns : non significatif ; $n \geq 5$; Les barres représentent les moyennes \pm ESM

III-6-2- Effets d'une double administration de l'extrait aqueux chez les BALB/C

III-6-2-1- Sur les transaminases sériques

La figure 36 représente les effets de l'extrait aqueux sur les transaminases sériques après 24h de traitement chez les souris BALB/C. Il n'y ressort aucune variation significative des transaminases sériques après traitement à l'extrait aqueux uniquement, comparé au groupe contrôle. L'induction de l'hépatite aiguë au CCl₄ a entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'ASAT (3 fold) et de l'ALAT (3 fold) après 24h, comparé aux contrôles. Le traitement concomitant du CCl₄ et de l'extrait aqueux a entraîné une diminution significative ($p < 0,05$) de l'ASAT (44%) et une diminution non significative de l'ALAT (22%) à la dose de 37,5 mg/kg. Le traitement à la silymarine n'a pas entraîné une variation significative des transaminases sériques à la dose étudiée (50 mg/kg).

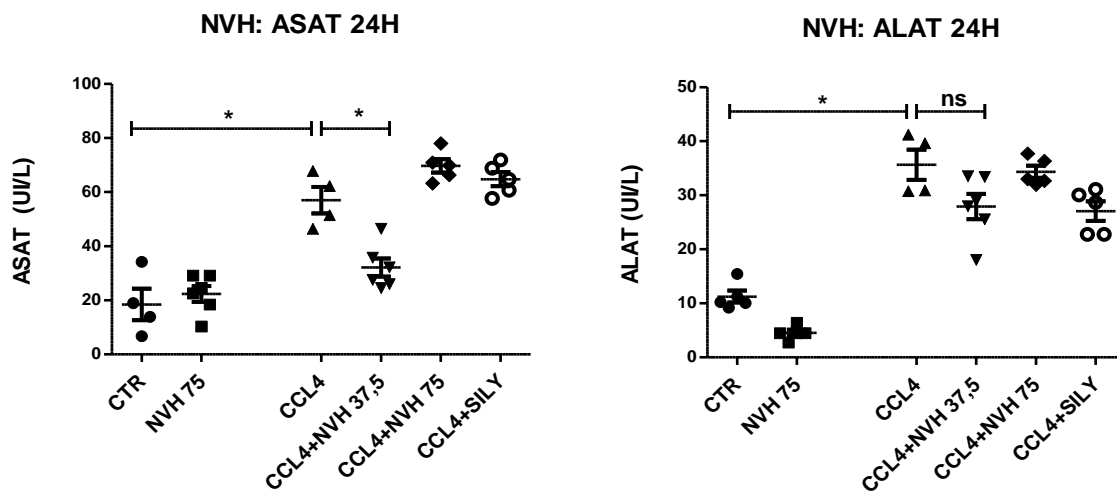


Figure 36 : Effets d'une double dose de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur les transaminases sériques.

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, SILY : Silymarine, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, ALAT : Alanine Aminotransférase, ASAT : Aspartate aminotransférase, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, non significatif. $n \geq 5$, Chaque point sur le graphique représente la valeur pour un animal. Les barres entre les points représentent les ESM

III-6-2-2- Sur les lésions hépatiques

La figure 37 montre l'effet d'une double administration de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur les lésions hépatiques induites par le CCl₄. L'administration de l'extrait aqueux à la dose de 75 mg/kg, sans induction de l'hépatite, n'a révélé aucune modification visible de l'architecture hépatique. L'injection du CCl₄ a entraîné des lésions nécrotiques localisées principalement autour des veines centrolobulaires. Après induction de l'hépatite au CCl₄, une double administration de l'extrait aqueux, a entraîné à 75 mg/kg comme à 150 mg/kg, une diminution des lésions nécrotiques, après 48h (Figure 37). Il a été observé à la dose de 37,5 mg/kg, une diminution plus marquée, se traduisant par la présence des lésions plus petites ou des lésions en cours de réparation, comparé au groupe CCl₄. De plus, 33% des animaux traités à l'extrait aqueux à 37,5 mg/kg n'ont pas présenté de lésions (Tableau XIV) mais plutôt des infiltrations leucocytaires autour des veines centrolobulaires. Ces infiltrations ont également été retrouvées à la dose de 75 mg/kg sur le site des lésions. Il a été observé une persistance des lésions après traitement à la silymarine chez tous les animaux à l'exception d'un seul animal chez qui il n'a été noté aucune lésion nécrotique (Tableau XIV).

Tableau XIV : Récapitulatif des animaux présentant un foie lésé après administration d'une double dose d'extrait aqueux et induction de l'hépatite au CCl₄

Groupes	Foie lésé	Foie en réparation	Foie normal
CTR	0/5	/	5/5
NVH 75	0/6	/	5/6
CCl ₄	5/5	0/5	0/5
CCl ₄ + NVH 37,5	2/6	2/6	2/6
CCl ₄ + NVH 75	3/5	2/5	0/5
CCl ₄ + silymarine	4/6	1/6	1/6

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone. Les fractions représentent le nombre d'animaux présentant un foie, soit lésé, soit en cours de réparation, soit normal sur le nombre total d'animaux dans le groupe.

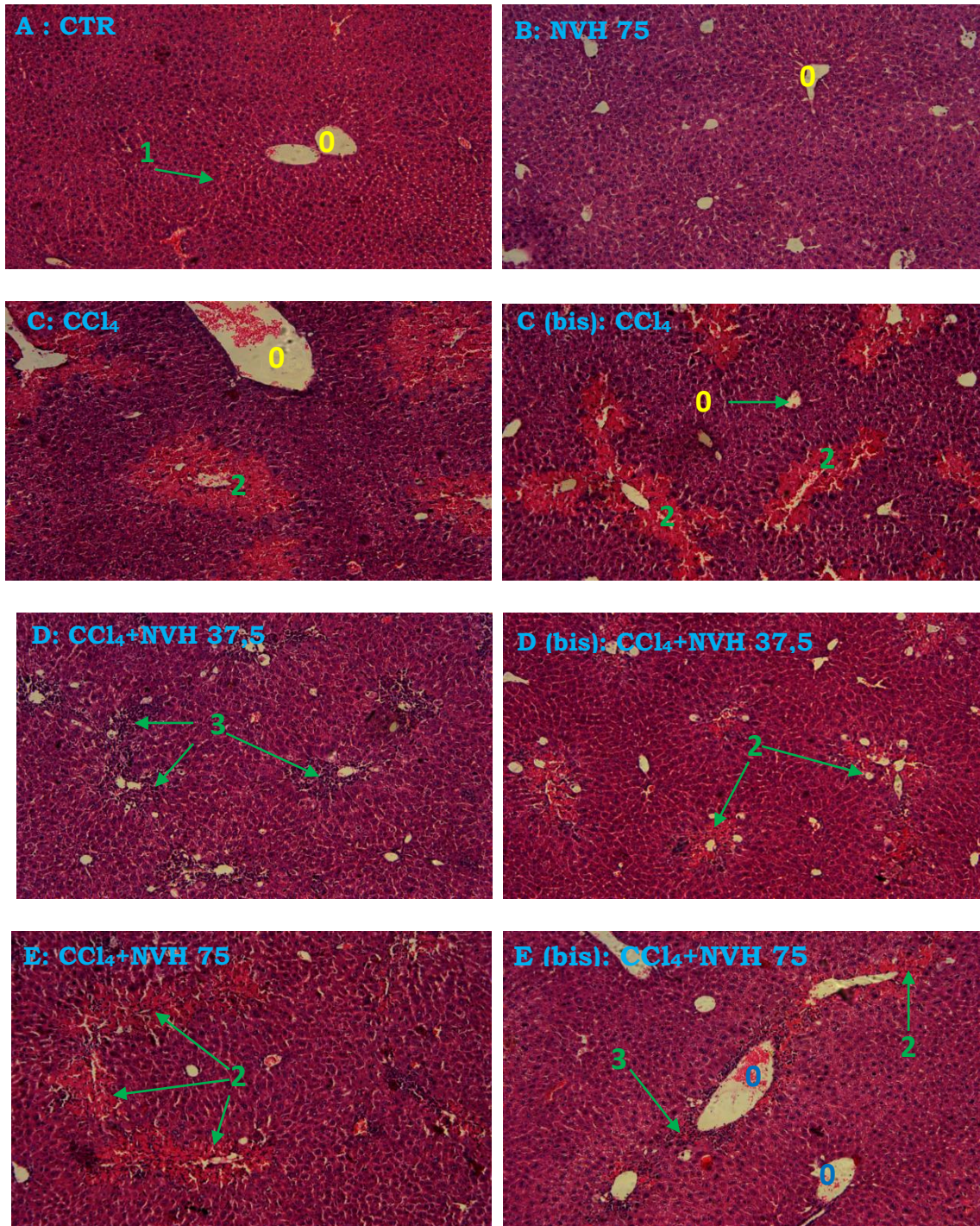


Figure 37 : Effets d'une double dose de l'extrait aqueux sur les lésions hépatiques induites par le CCl₄ (HE x 100).

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone. A et B : Foie normal avec les veines centrolobulaires (0) et les hépatocytes (1), C et C (bis) : Foie des souris traitées au CCl₄, présence des lésions (2), D et D (bis) : Foie des souris traitées à l'extrait aqueux à la dose de 37,5 mg/kg, présence des infiltrats (3) et des lésions (2), D et D (bis) : Foie des souris traitées à l'extrait aqueux à la dose de 75 mg/kg, présence des infiltrats (3) et de lésions (2).

III-6-2-3- Sur le malondialdéhyde, les nitrites et quelques antioxydants endogènes (Catalase, glutathion et superoxyde dismutase)

III-6-2-3-1- Sur le malondialdéhyde et les nitrites

Les effets de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur le malondialdéhyde et les nitrites sont représentés sur la figure 38. Comparé aux contrôles, il n'a été noté aucune variation significative des nitrites après une double administration de l'extrait aqueux uniquement (dose de 75 mg/kg) alors qu'il a été noté une diminution significative du malondialdéhyde ($p < 0,01$; 42%). L'induction de l'hépatite au CCl_4 a entraîné une augmentation significative des nitrites ($p < 0,01$; 1,6 fold) et du malondialdéhyde ($p < 0,001$; 3 fold), comparé aux contrôles. Le traitement à l'extrait aqueux après induction de l'hépatite, a entraîné après 48h, une diminution significative des nitrites aux doses de 37,5 mg/kg ($p < 0,01$; 49%) et 75 mg/kg ($p < 0,01$; 43%) et une diminution significative du malondialdéhyde aux doses de 37,5 mg/kg ($p < 0,001$; 70%) et 75 mg/kg ($p < 0,01$; 81%), comparé au groupe CCl_4 . Le traitement à la silymarine après induction de l'hépatite a entraîné une diminution significative des nitrites ($p < 0,01$; 46%) et du malondialdéhyde ($p < 0,01$; 53%).

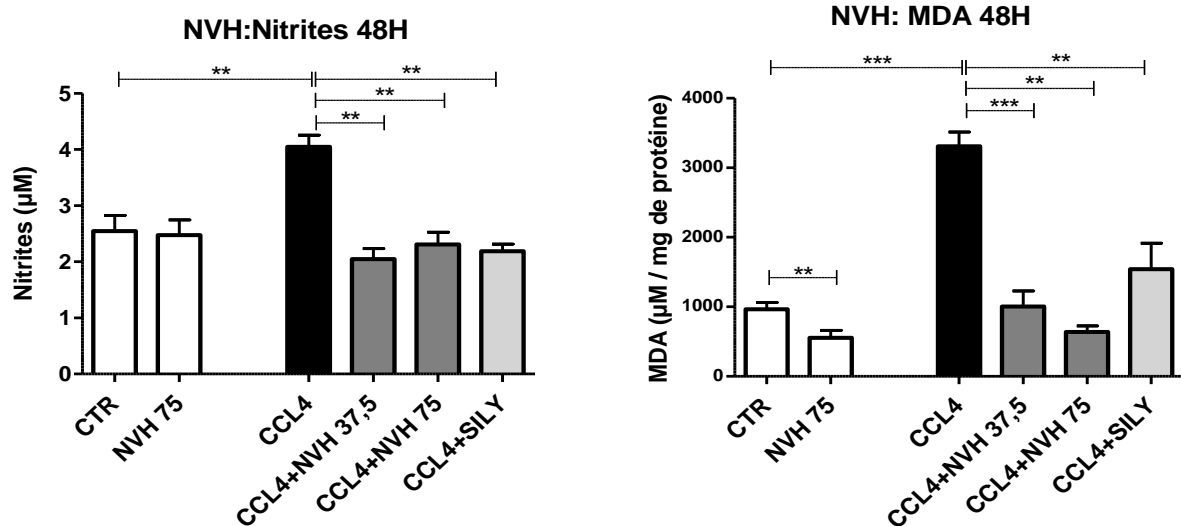


Figure 38 : Effets d'une double dose de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur les nitrites et le malondialdéhyde (MDA).

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl_4 : Tétrachlorure de carbone, SILY : Silymarine, MDA : Malondialdéhyde, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n \geq 5$; Les barres représentent les moyennes \pm ESM.

III-6-2-3-2- Sur le taux hépatique de quelques antioxydants (SOD, Catalase) et du glutathion réduit (GSH).

La figure 39 présente les effets d'une double administration de l'extrait aqueux de *N.velutina* sur la superoxyde dismutase totale (SODt), la catalase et le glutathion (GSH). Il apparaît chez les animaux traités à l'extrait aqueux uniquement (75 mg/kg), comparés aux contrôles, une diminution significative de l'activité de la SODt ($p < 0,05$; 15%), une diminution significative du glutathion ($p < 0,01$; 31%) et une augmentation significative de la catalase ($p < 0,05$; 1,1 fold). L'induction de l'hépatite au CCl_4 a entraîné une diminution significative de l'activité de la SODt ($p < 0,01$; 41%) et une diminution significative du glutathion ($p < 0,01$; 29%), comparée aux contrôles. Aucune variation significative de la catalase n'a été notée après induction de l'hépatite. Le traitement à l'extrait aqueux a entraîné, comparé aux contrôles CCl_4 , une augmentation significative de l'activité de la SODt aux doses de 37,5 mg/kg ($p < 0,01$; 22%) et 75 mg/kg ($p < 0,05$; 26%), une diminution significative de la catalase à la dose de 75 mg/kg ($p < 0,01$; 32%) et une diminution significative du glutathion à la dose de 75 mg/kg ($p < 0,05$; 23%). Comparé aux contrôles CCl_4 , le traitement à la silymarine a entraîné une augmentation significative de la SODt ($p < 0,05$; 25%) et une augmentation significative de la catalase ($p < 0,05$; 13%). Aucune variation significative du taux de glutathion n'a été notée après traitement à la silymarine.

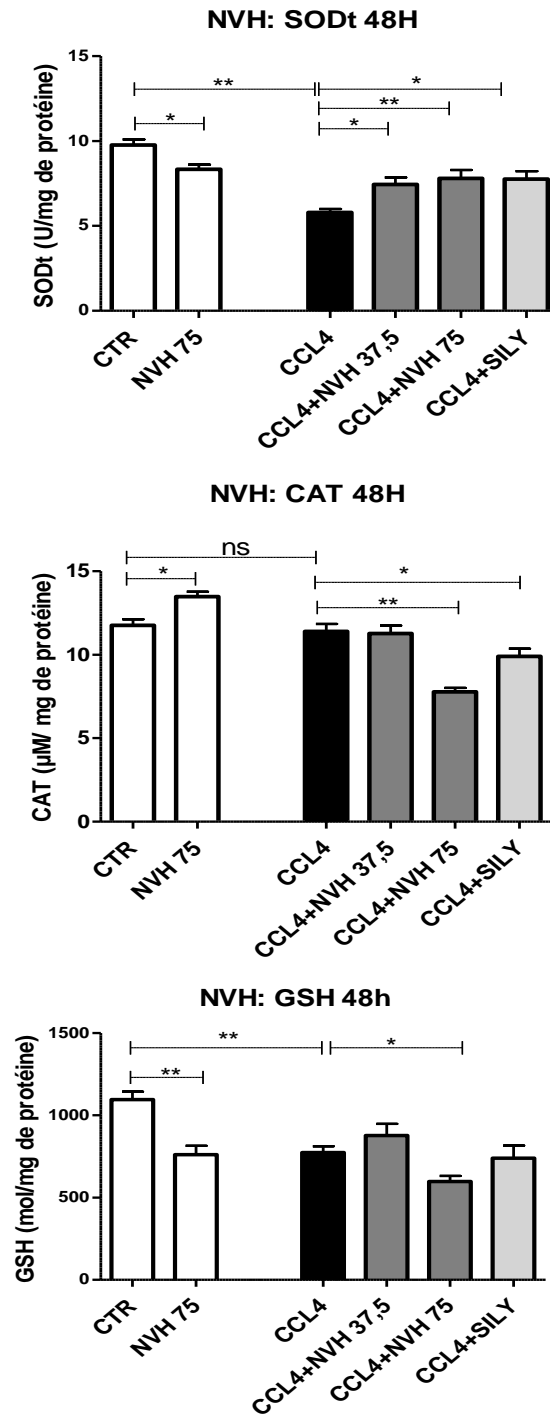


Figure 39 : **Effets d'une double dose de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur le glutathion (GSH), l'activité de la superoxyde dismutase totale (SODt) et de la catalase**

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, SILY : Silymarine, SODt : Superoxyde dismutase totale, GSH : Glutathion réduit, CAT : Catalase, *p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; n≥5. Les barres représentent les moyennes ± ESM.

III-6-3- Effets d'une double administration de l'extrait éthanolique sur les transaminases sériques (ASAT et ALAT)

Le tableau XV présente les effets de l'extrait éthanolique de *N. velutina* sur les transaminases sériques après 48h de traitement. Il a été noté une mortalité dans les groupes traités à l'extrait éthanolique avec ou sans induction de l'hépatite aiguë au CCl₄. Soit 60%, 80% et 100% de mortalité respectivement dans le groupe des animaux traités uniquement à l'extrait éthanolique à 150 mg/kg, le groupe des animaux traités à l'extrait éthanolique à la dose de 75 mg/kg après induction de l'hépatite et le groupe des animaux traités à l'extrait éthanolique à la dose de 150 mg/kg après induction de l'hépatite. L'induction de l'hépatite a entraîné une augmentation significative de l'ASAT ($p < 0,001$; 3 fold) et de l'ALAT ($p < 0,001$; 5 fold), comparé aux contrôles. Comparé au groupe CCl₄, il a été noté une augmentation de l'ASAT (30 fold) et de l'ALAT (38 fold) chez les survivants traités à l'extrait éthanolique à 75 mg/kg après induction de l'hépatite.

Tableau XV : Effets d'une double administration de l'extrait éthanolique sur les transaminases sériques

Groupes	ASAT (UI/L)	ALAT (UI/L)
CTR	73,33±4,41 (10)	54,44±9,59 (10)
NVE 150	120±37,86 (4)	82,5±28,69 (4)
CCl ₄	194±21,87 (10) ***	259±28,10 (10)***
CCl ₄ +NVE 75	5915±2105 (2)	9905±2055 (2)
CCl ₄ +NVE 150	- (0)	- (0)

CTR : contrôle, NVE : extrait éthanolique, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, les valeurs dans le tableau représentent les moyennes ± ESM. Les valeurs entre parenthèses représentent les survivants. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n=10 au départ.

CONCLUSION PARTIELLE

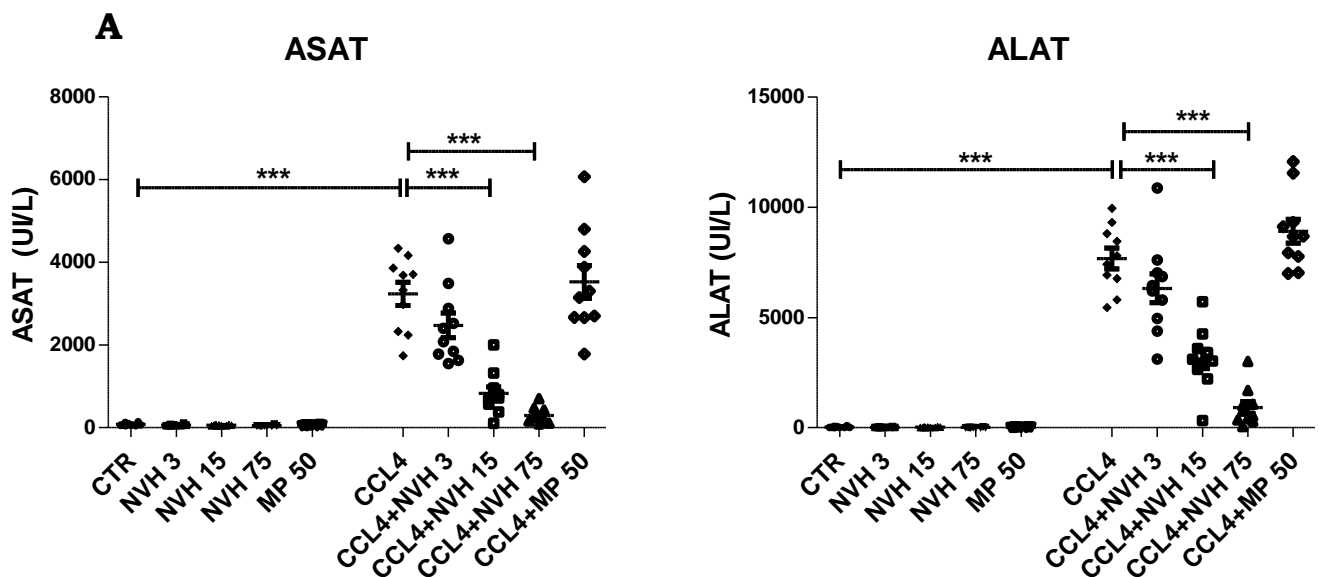
Au regard de la forte mortalité notée chez la souris après administration de l'extrait éthanolique et compte tenu de sa cytotoxicité, l'extrait éthanolique apparaît comme étant plus toxique que l'extrait aqueux aux doses que nous avons étudiées. Ainsi, dans les conditions de cette étude, bien que l'extrait éthanolique semble plus efficace et plus riche que l'extrait aqueux, nous notons que l'extrait aqueux est le moins toxique tout en présentant une activité hépatoprotectrice. C'est donc que nous avons choisi dans un premier temps de mieux caractériser l'effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux et de procéder à son fractionnement.

III-7- EFFETS PREVENTIFS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE *N. VELUTINA*

III-7-1- EFFETS PREVENTIFS SUR L'HEPATITE AIGUE INDUITE PAR LE CCL₄

III-7-1-1- Sur les transaminases sériques

En traitement préventif, les effets de l'extrait aqueux de *N. velutina* ont été évalués au regard du taux des transaminases sériques avec ou sans induction de l'hépatite aiguë. L'administration de l'extrait aqueux seul ou à de la méthylprednisolone seule n'a entraîné aucune variation significative du taux des transaminases, comparé aux contrôles. L'induction de l'hépatite aiguë a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'ASAT (40 fold) et de l'ALAT (213 fold), comparé aux contrôles. Le traitement à l'extrait aqueux a entraîné une diminution dose dépendante du taux de transaminases, comparé aux contrôles CCl₄. Cette diminution est notée significative ($p < 0,001$) aux doses de 15 mg/kg et 75 mg/kg avec respectivement, 74% et 59% de diminution pour l'ASAT et l'ALAT à 15 mg/kg, 91% et 88% de diminution pour l'ASAT et l'ALAT à 75 mg/kg. Le traitement à la méthylprednisolone n'a pas entraîné une diminution des transaminases à la dose étudiée (50 mg/kg) (Figure 40A). En outre, il a été noté une corrélation positive entre l'ASAT et l'ALAT (Figure 40B).



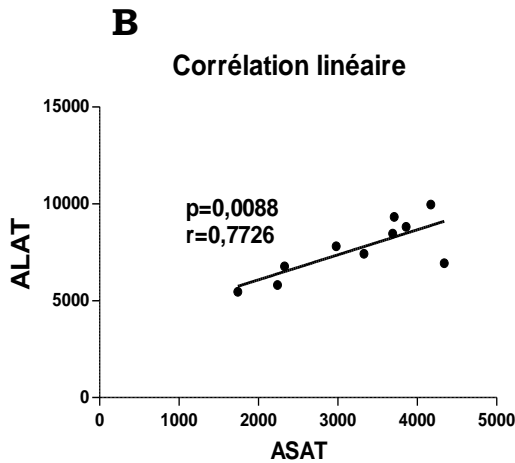


Figure 40 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur les transaminases sériques.

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, MP : Méthylprednisolone, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, ASAT : Aspartate aminotransférase, ALAT : Alanine aminotransférase, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$, $n=10$, Chaque point sur le graphique représente la valeur pour un animal. Les barres entre les points représentent les ESM.

III-7-1-2- Sur les lésions hépatiques induites par le CCl₄

Les effets du traitement préventif à l'extrait aqueux ont été évalués sur les lésions hépatiques résultantes de l'administration du CCl₄. Il a été observé, en comparaison aux animaux contrôles (Figure 41A et B), une architecture normale du foie après administration de l'extrait aqueux ou de la méthylprednisolone sans induction de l'hépatite (Figure 41, C à J). L'administration du CCl₄ a induit des lésions nécrotiques majoritairement localisées autour des veines centrolobulaires (Figure 42 A et B). Le traitement à l'extrait aqueux a entraîné une diminution dose dépendante des lésions (Figure 42, C à H) allant jusqu'à la réparation totale du foie aux doses de 15 et 75 mg/kg (Figure 42 E à H). Soit à 15 mg/kg, 40% d'animaux présentant un foie en cours de réparation et 20% d'animaux présentant un foie réparé. A 75 mg/kg, 60% d'animaux présentant un foie en cours de réparation et 40% présentant un foie réparé, avec des infiltrations leucocytaires (Tableau XVI). Le traitement à la méthylprednisolone n'a pas entraîné une réparation hépatique (Figure 42 I et J).

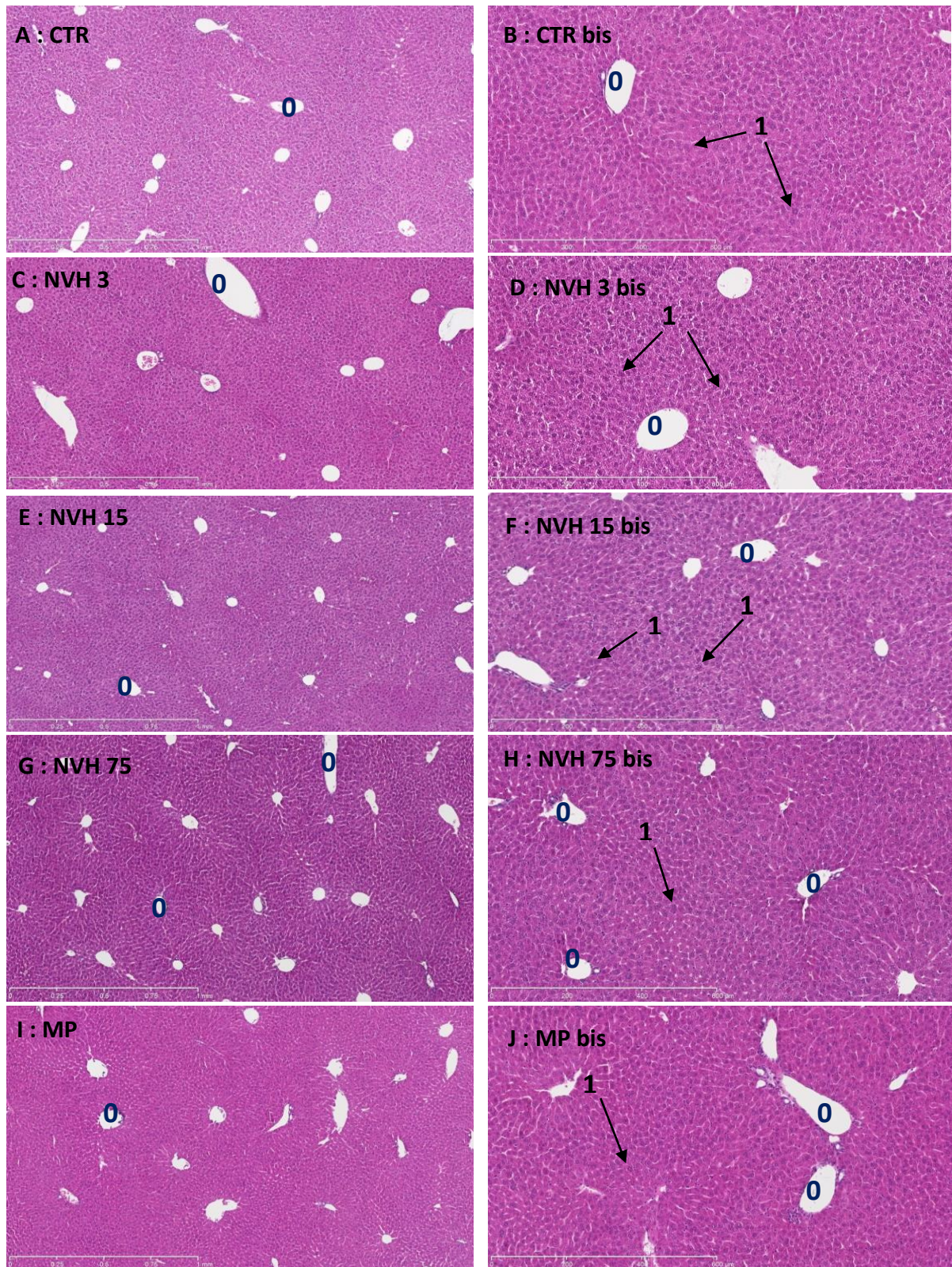


Figure 41 : Effets préventifs de l'extrait aqueux ou de la méthylprednisolone sans induction de l'hépatite (HE x 5 ; HE x 100)

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl_4 : Tétrachlorure de carbone, MP : Méthylprednisolone, Veine centrolobulaire (0), Hépatocytes (1). HE X 5 : à gauche, HE X 100 : à droite.

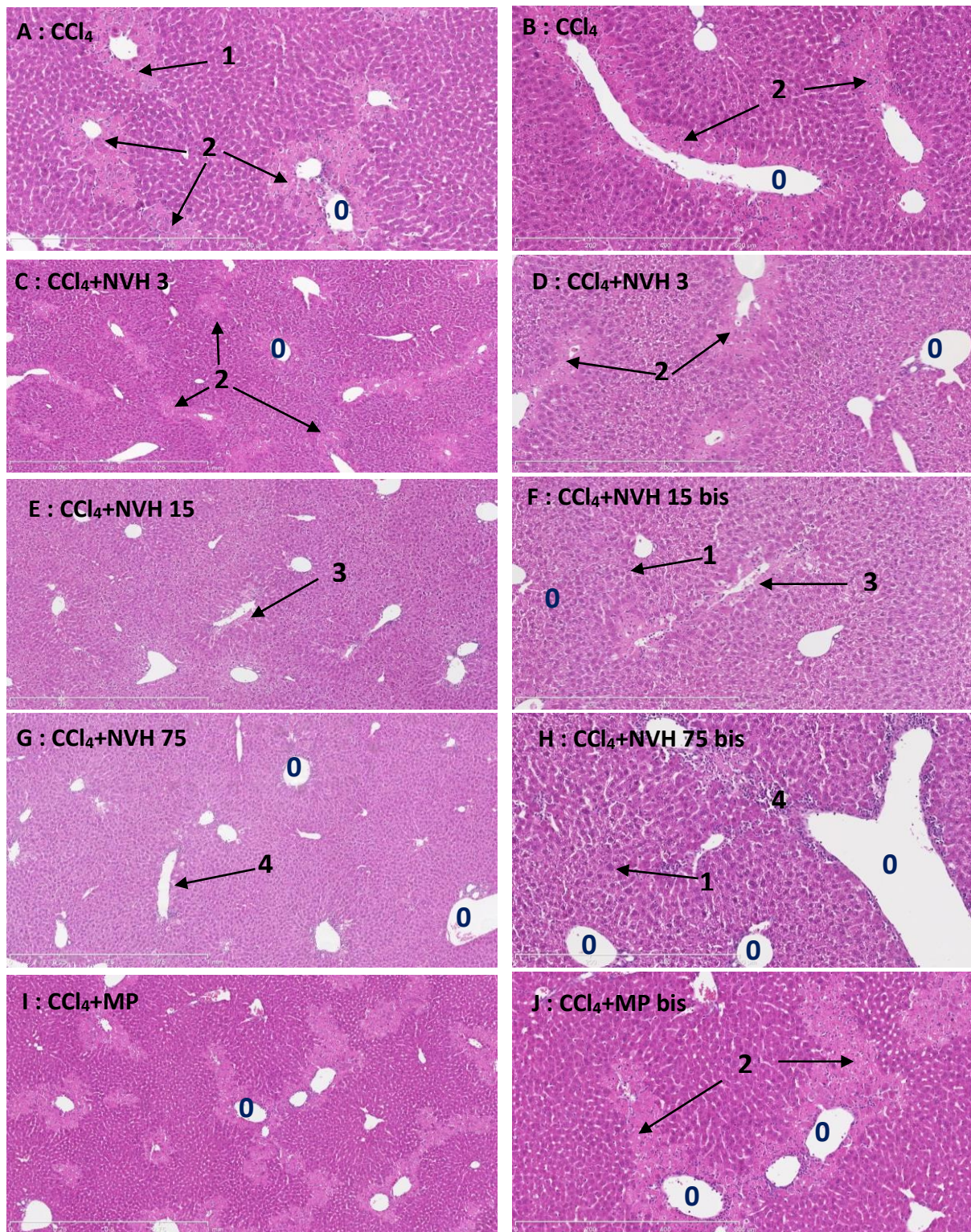


Figure 42 : Effets d'une administration préventive de l'extrait aqueux sur les lésions hépatiques induites par le CCl₄ (HE x 5 ; HE x 100)

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, MP : Méthylprednisolone, Veine centrolobulaire (0), Hépatocytes (1), Lésions nécrotiques (2), Lésion en réparation (3), Lésion réparée avec infiltration leucocytaire (4). HE X 5 : à gauche, HE X 100 : à droite.

Tableau XVI : Récapitulatif des animaux présentant un foie lésé après prétraitement à l'extrait aqueux et induction de l'hépatite au CCl₄

Groupes	Foie lésé	Foie en réparation	Foie réparé
CTR	0 / 5	/	5/5
NVH 3	0 / 5	/	5/5
NVH 15	0 / 5	/	5/5
NVH 75	0 / 5	/	5/5
MP 50	0 / 5	/	5/5
CCl ₄	5/5	0/5	0/5
CCl ₄ +NVH 3	5/5	0/5	0/5
CCl ₄ +NVH 15	2/5	2/5	1/5
CCl ₄ +NVH 75	0/5	3/5	2/5
CCl ₄ +MP	5/5	0/5	0/5

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, MP : Méthylprednisolone. Les fractions représentent le nombre d'animaux présentant un foie, soit lésé, soit en cours de réparation, soit normal sur le nombre total d'animaux dans le groupe.

III-7-1-3- Sur l'expression de quelques cytokines proinflammatoires, iNOS et COX-2

La figure 43 montre les effets de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur l'expression de TNF α , IL1- β , IL-6, iNOS et COX-2. Comparé aux contrôles, il n'y ressort aucune variation significative de l'expression de TNF α , IL1- β , IL-6, iNOS et COX-2, chez les traités à l'extrait aqueux ou à la méthylprednisolone seuls ; excepté à la dose de 3 mg/kg où il est noté une augmentation significative de IL1- β (p<0,01 ; 5 fold) et IL-6 (p<0,05 ; 3 fold). L'induction de l'hépatite aiguë a entraîné une augmentation significative de TNF α (p<0,01 ; 7 fold), IL1- β (p<0,05 ; 2 fold), IL-6 (p<0,05 ; 2 fold) et COX-2 (p<0,05 ; 6 fold), comparé aux contrôles. Aucune variation significative de iNOS n'a été notée après induction de l'hépatite. Comparé aux contrôles CCl₄, le traitement à l'extrait aqueux avant induction de l'hépatite a entraîné, une diminution significative de TNF α (p<0,05 ; 66%) et COX-2 (p<0,01 ; 83%) à la dose de 15 mg/kg et une diminution significative de IL1- β (p<0,05 et p<0,001) et IL-6 (p<0,05 et p<0,01) à toutes les doses. Soit 55%, 73% et 46% de diminution de IL1-

β aux doses de 3, 15 et 75 mg/kg respectivement ; 72%, 86% et 45% de diminution de IL-6 aux doses de 3, 15 et 75 mg/kg respectivement. Le traitement à l'extrait aqueux avant induction de l'hépatite n'a entraîné aucune variation significative de iNOS comparé aux contrôles CCl₄. Le traitement à la méthylprednisolone a entraîné une diminution significative de TNFα (p<0,01 ; 83%), IL1-β (p<0,001 ; 84%), IL-6 (p<0,01 ; 78%), iNOS (p<0,01 ; 79%) et COX-2 (p<0,05 ; 89%).

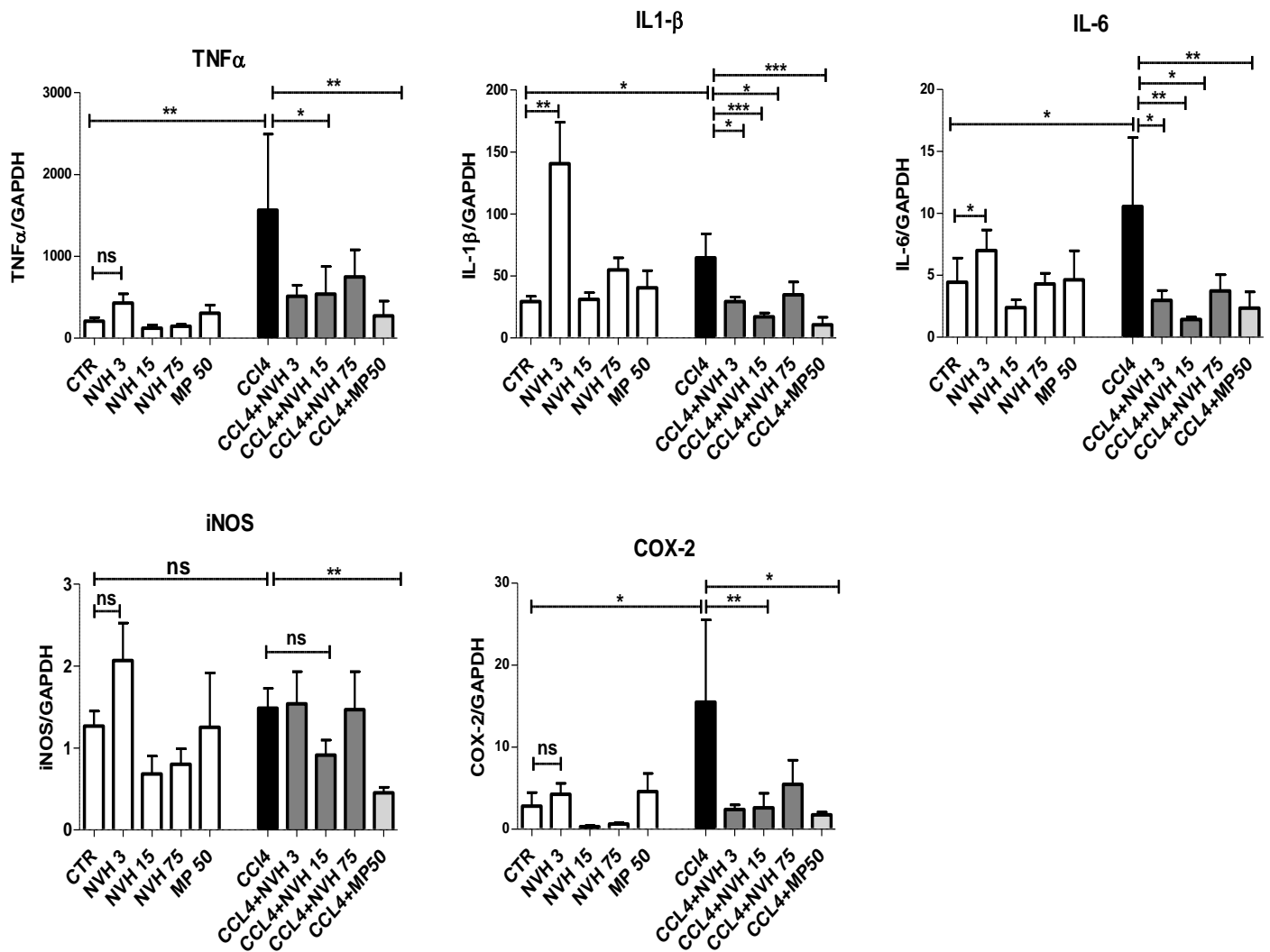


Figure 43 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur le TNFα, IL1-β, IL-6, iNOS et COX-2.

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, TNFα : Tumor Necrosis Factor alpha, IL-1β : Interleukine 1 beta, iNOS : inductible Nitrite Oxide Synthétase, COX-2 : Cyclooxygénase 2, IL-6 : Interleukine 6, *p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001, ns : non significatif, n=10. Les barres représentent les moyennes ± ESM.

III-7-1-4- Sur la prolifération hépatocytaire : Marquage PCNA

Dans le but d'évaluer l'effet de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur la prolifération hépatocytaire, un marquage PCNA a été fait sur des coupes tissulaires. Il n'a ainsi été noté aucune prolifération particulière des hépatocytes chez tous les animaux quelque soit le groupe. Par contre, chez les animaux contrôles traités au CCl₄, il a été remarqué une légère activité prolifératrice de cellules non identifiées et majoritairement concentrées autour des veines centrolobulaires. Par ailleurs, après induction de l'hépatite, le traitement à l'extrait ou à la méthylprednisolone a révélé une forte activité prolifératrice de ces cellules non identifiées autour des veines centrolobulaires (Figure 44).

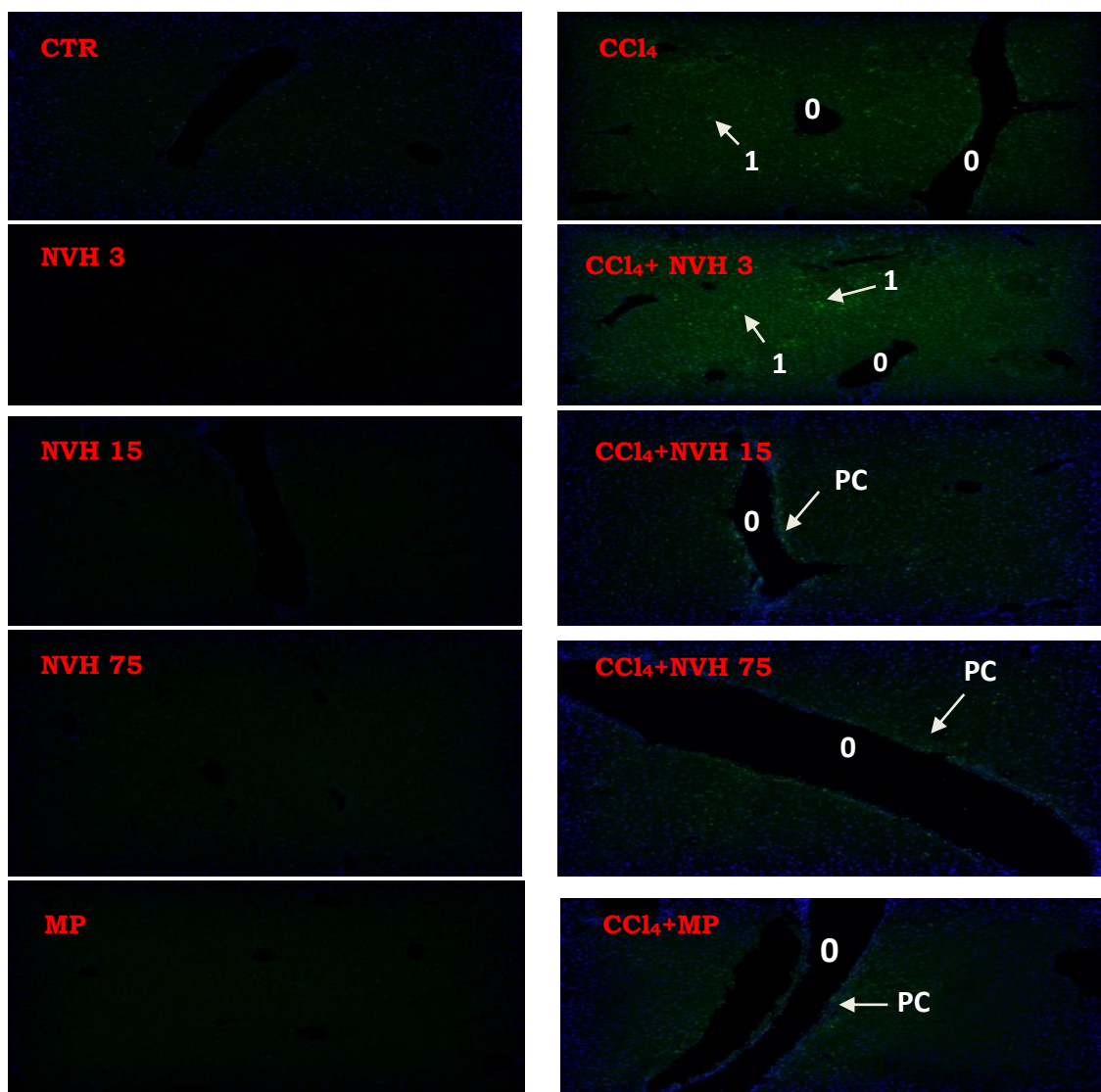


Figure 44 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur la prolifération cellulaire.

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, MP : Méthylprednisolone, (0) : Veine centrolobulaire, (1) : Cellule en prolifération, PC : Prolifération centrolobulaire.

III-7-1-5- Identification des cellules en prolifération active

Dans le but de se faire une idée sur la nature des cellules en prolifération active dans le tissu hépatique des animaux après traitement à l'extrait aqueux ou à la méthylprednisolone, l'expression de l' α SMA et de quelques facteurs de croissance et chimiokines a été évaluée.

III-7-1-5-1- Expression de quelques facteurs de croissance et de l' α SMA

La figure 45 montre les effets de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur l'expression du TGF β , PDGFB, HGF et α SMA. Il n'y apparait aucune différence significative de l'expression du HGF entre les différents groupes et quelque soit la dose et les conditions. Comparé aux contrôles, le traitement à l'extrait aqueux ou à la méthylprednisolone seuls, n'a entraîné aucune variation significative de TGF β , PDGFB et α SMA, excepté à la dose d'extrait à 3 mg/kg où il a été noté une augmentation significative de PDGFB ($p < 0,05$; 2 fold) et α SMA ($p < 0,05$; 3 fold). L'induction de l'hépatite aiguë a entraîné une augmentation significative de l'expression de TGF β ($p < 0,05$; 1,8 fold), PDGFB ($p < 0,05$; 2 fold) et α SMA ($p < 0,001$; 13 fold), comparé aux contrôles. Comparé aux contrôles CCl₄, le traitement à l'extrait aqueux avant induction de l'hépatite a entraîné une diminution significative de TGF β ($p < 0,01$; 58%) et PDGFB ($p < 0,01$; 61%) à la dose de 15 mg/kg et une diminution significative de α SMA aux doses de 15 mg/kg ($p < 0,01$; 70%) et 75 mg/kg ($p < 0,01$; 71%). Le traitement à la méthylprednisolone avant induction de l'hépatite a entraîné une diminution significative du TGF β ($p < 0,05$; 31%), du PDGFB ($p < 0,01$; 60%) et de l' α SMA ($p < 0,01$; 63%), comparé aux contrôles CCl₄.

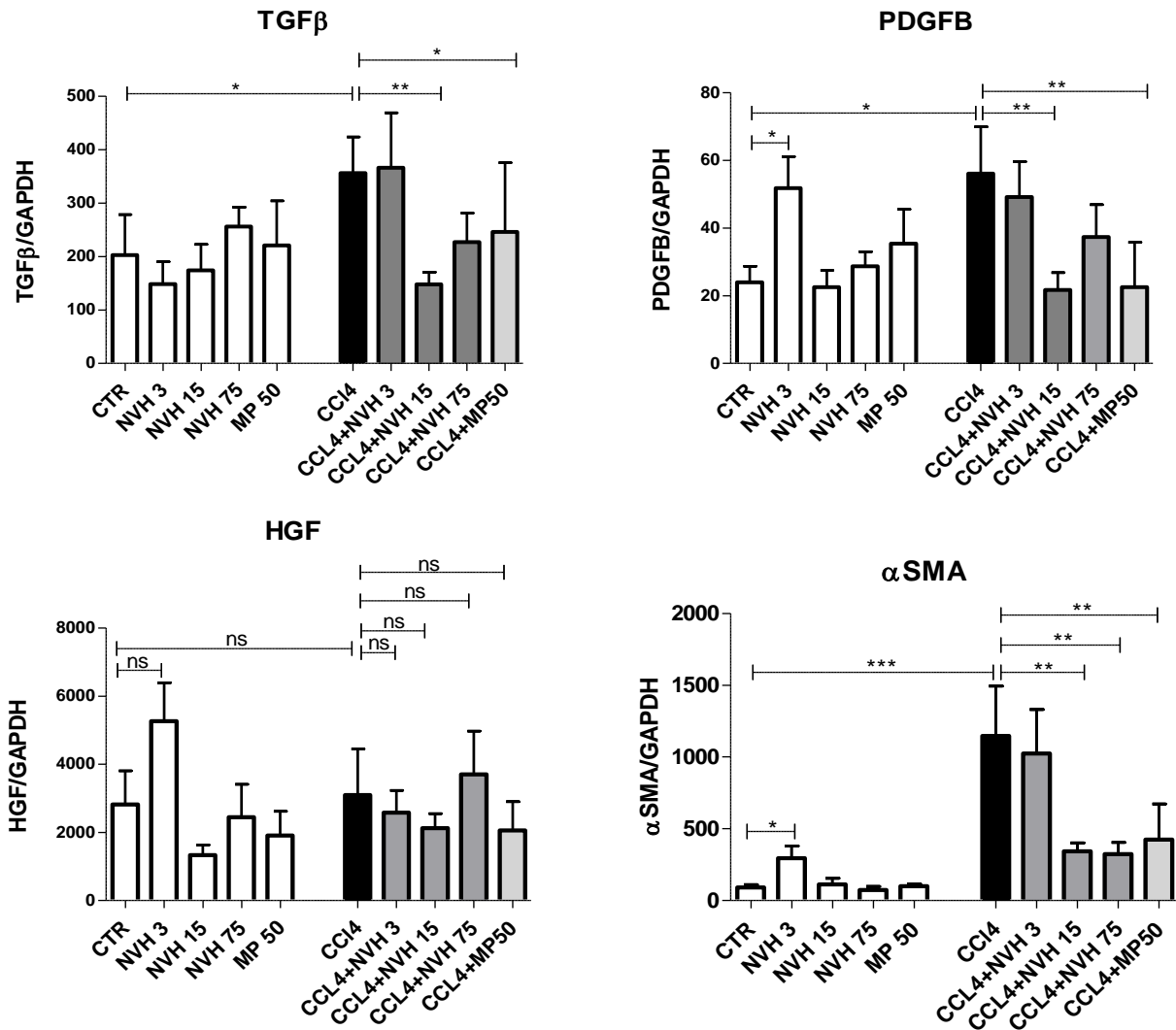


Figure 45 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur l'expression du TGFβ, PDGFB, HGF et αSMA .

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, TGFβ : Transforming Growth Factor beta, PDGFB : Platelet Derive Growth Factor B, HGF : Hepatocyte Growth Factor, αSMA : alpha smooth muscle actin *p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001, ns: non significatif. n=10. Les barres représentent les moyennes ± ESM

III-7-1-5-2- Expression de quelques chimiokines et leur récepteur CXCR-2

La figure 46 montre les effets de l'extrait aqueux sur le récepteur CXCR-2 et les chimiokines CXCL-1/KC, CXCL-2/MIP-2, CXCL-5/LIX. Elle ne révèle aucune différence significative de l'expression de CXCL-1/KC entre les différents groupes. Par ailleurs, dans les groupes traités à l'extrait aqueux ou à la méthylprednisolone uniquement, comparés aux contrôles, il n'a été noté aucune variation significative de l'expression de CXCR-2, CXCL-2/MIP-2 et CXCL-5/LIX à toutes les doses de l'extrait aqueux et de la méthylprednisolone ; à l'exception de la dose d'extrait à 3 mg/kg où il a été noté une augmentation significative ($p < 0,05$) de CXCR-2 (3 fold) et CXCL-2/MIP-2 (2 fold). Comparé aux contrôles, l'induction de l'hépatite a entraîné une augmentation significative de l'expression de CXCR-2 ($p < 0,001$; 7 fold), CXCL-2/MIP-2 ($p < 0,01$; 4 fold) et CXCL-5/LIX ($p < 0,01$; 7 fold). Le traitement à l'extrait aqueux a entraîné comparé aux contrôles CCl₄, une diminution significative de CXCR-2 ($p < 0,05$; 56%) et CXCL-2/MIP-2 ($p < 0,05$; 77%) à la dose de 15 mg/kg et une diminution significative de CXCL-5/LIX aux doses de 3 mg/kg ($p < 0,01$; 81%), 15 mg/kg ($p < 0,01$; 85%) et 75 mg/kg ($p < 0,01$; 81%). Le traitement à la méthylprednisolone a entraîné une diminution significative de CXCR-2 ($p < 0,01$; 64%), CXCL-2/MIP-2 ($p < 0,05$; 63%) et CXCL-5/LIX ($p < 0,001$; 93%), comparé aux contrôles CCl₄.

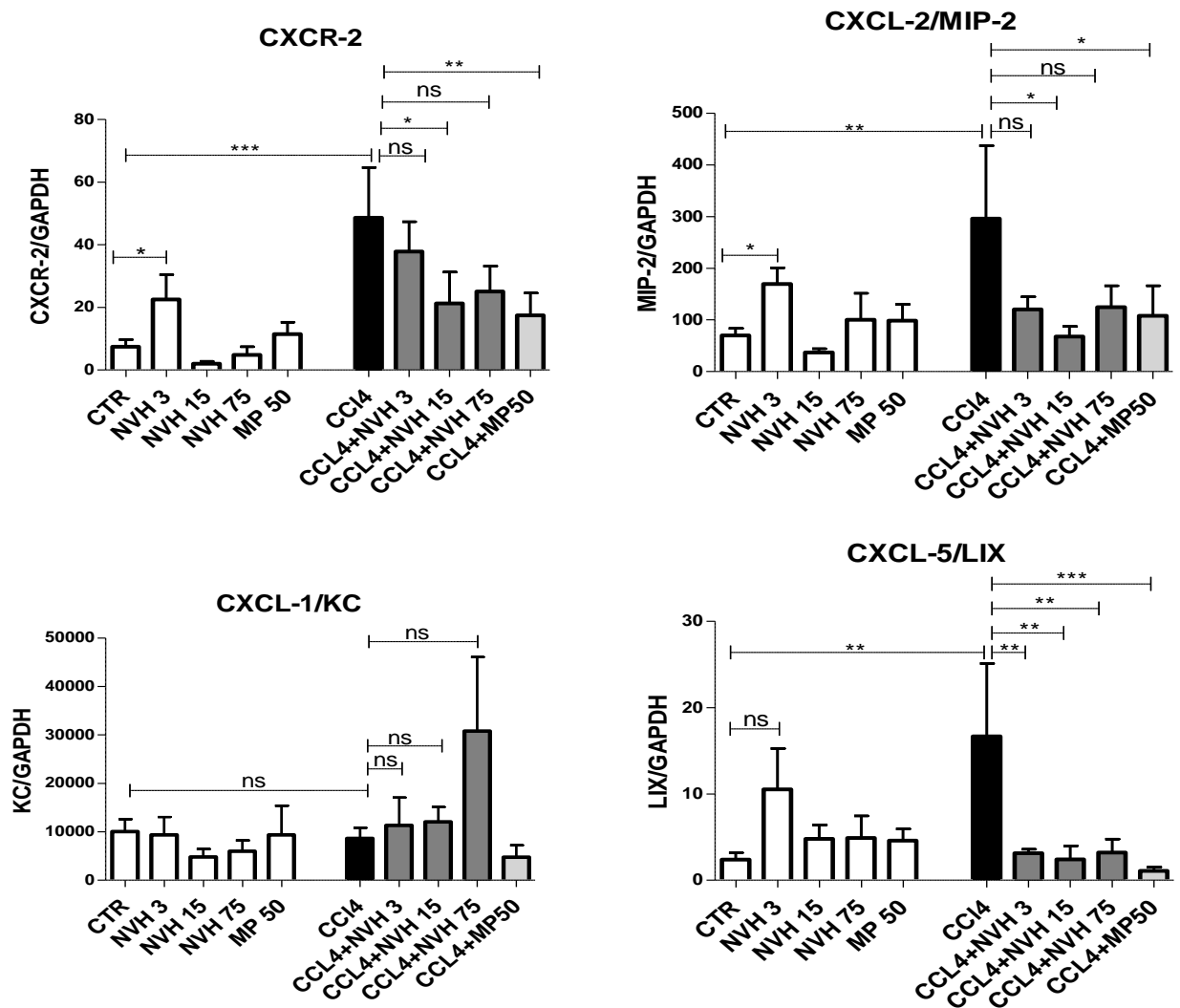


Figure 46 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur l'expression de CXCR-2, CXCL-1/KC, CXCL-2/MIP-2 et CXCL-5/LIX.

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, CXCL-1/KC : ligand 1 de la famille des chimiokines CXC, CXCL-2/MIP-2 : Ligand 2 de la famille CXC/Macrophage Inibitory Protein, CXCL-5/LIX : Ligand 5 de la famille CXC, *p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001, ns : non significatif. n=10. Les barres représentent les moyennes ± ESM

III-7-1-6- Sur l'expression de quelques antioxydants : SOD-1, SOD-2, SOD-3, CATALASE et GPX-1.

La figure 47 montre les effets de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur l'expression de quelques antioxydants. Il n'y ressort aucune différence significative de l'expression de GPX-1 entre les différents groupes et quelques soient les conditions. Par ailleurs, comparés aux contrôles, il n'a été noté aucune différence significative de l'expression de la SOD-1, SOD-2, SOD-3 et catalase dans les groupes traités à l'extrait aqueux ou à la méthylprednisolone uniquement, à toutes les doses de l'extrait aqueux et de la méthylprednisolone; à l'exception de la dose d'extrait à 3 mg/kg où il a été noté une augmentation significative ($p < 0,05$) de la SOD-1 (2 fold), la SOD-2 (2 fold) et la catalase (2 fold). Comparé aux contrôles, l'induction de l'hépatite aiguë n'a entraîné aucune variation significative de l'expression de la SOD-1, la SOD-2 et la catalase tandis qu'il a été noté une augmentation significative de la SOD-3 ($p < 0,05$; 3 fold). Comparé aux contrôles CCl_4 , le traitement à l'extrait aqueux avant induction de l'hépatite n'a entraîné aucune variation significative de l'expression de la SOD-1, la SOD-2 et la catalase, tandis qu'il a été noté une diminution significative de la SOD-3 aux doses de 15 mg/kg ($p < 0,05$; 52%) et 75 mg/kg ($p < 0,05$; 47%). Le traitement à la méthylprednisolone avant induction de l'hépatite aiguë a entraîné une diminution significative de la SOD-1 ($p < 0,05$; 38%), la SOD-2 ($p < 0,05$; 45%), la SOD-3 ($p < 0,01$; 52%) et la catalase ($p < 0,05$; 58%), comparé aux contrôles CCl_4 .

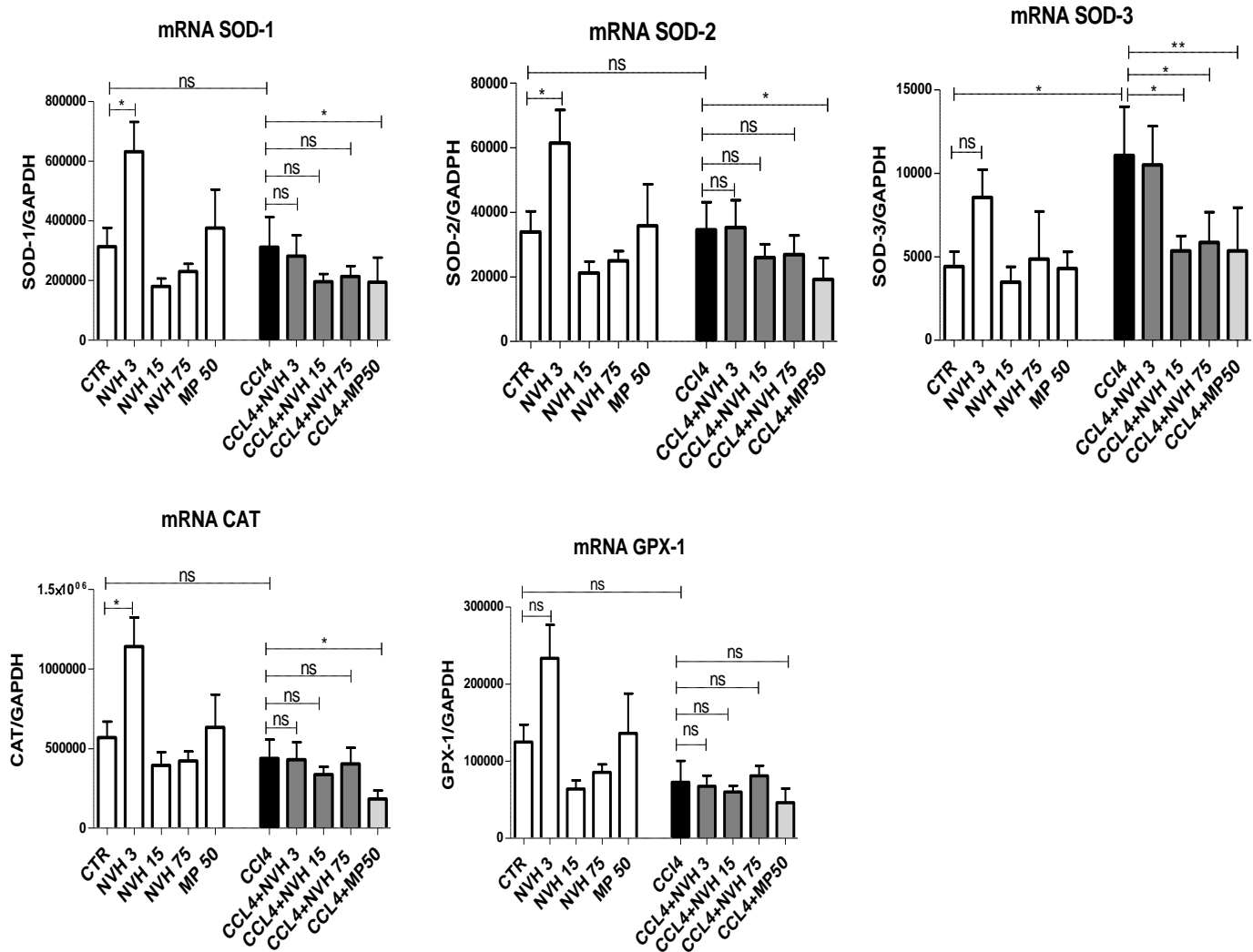


Figure 47 : **Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur l'expression de la SOD-1, SOD-2, SOD-3, CATALASE et GPX-1.**

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, CAT : catalase, GPX-1 : Glutathion peroxydase, SOD-1 : Superoxyde dismutase 1, SOD-2 : Superoxyde dismutase 2, SOD-3 : Superoxyde dismutase 3, *p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001, ns : non significatif. n=10. Les barres représentent les moyennes ± ESM

III-7-1-7- Sur le malondialdéhyde (MDA), le glutathion réduit (GSH) et l'activité de la catalase et des superoxydes dismutases

La figure 48 montre les effets de l'extrait aqueux sur le malondialdéhyde (MDA), la catalase (CAT), le glutathion réduit (GSH), la SOD-2 et la SOD totale. Il n'y apparaît aucune variation significative de l'activité de la SOD-2 et la SOD totale, entre les différents groupes, quelques soient les doses et les conditions. Par contre, comparé aux contrôles, le traitement à l'extrait aqueux ou à la méthylprednisolone uniquement a entraîné une augmentation significative du MDA aux doses de 15 mg/kg ($p < 0,01$; 1,2 fold) et 75 mg/kg ($p < 0,05$; 1,2 fold) et de la catalase à la dose de 15 mg/kg ($p < 0,01$; 1,8 fold). Il n'a été noté aucune variation significative de la GSH. Comparé aux contrôles, l'induction de l'hépatite aiguë a entraîné une augmentation significative de la catalase ($p < 0,001$; 3 fold) tandis qu'il n'a été noté aucune variation significative du MDA et de la GSH. Le traitement à l'extrait aqueux avant induction de l'hépatite n'a entraîné aucune variation significative de la catalase et de la GSH tandis qu'il est noté une diminution significative du MDA à la dose de 75 mg/kg ($p < 0,05$; 36%), comparé aux contrôles CCl_4 . Le traitement à la méthylprednisolone avant induction de l'hépatite, a entraîné une diminution significative du MDA ($p < 0,05$; 22%), une diminution significative de la catalase ($p < 0,001$; 48%) et une augmentation significative de la GSH ($p < 0,01$; 1,2 fold), comparé aux contrôles CCl_4 .

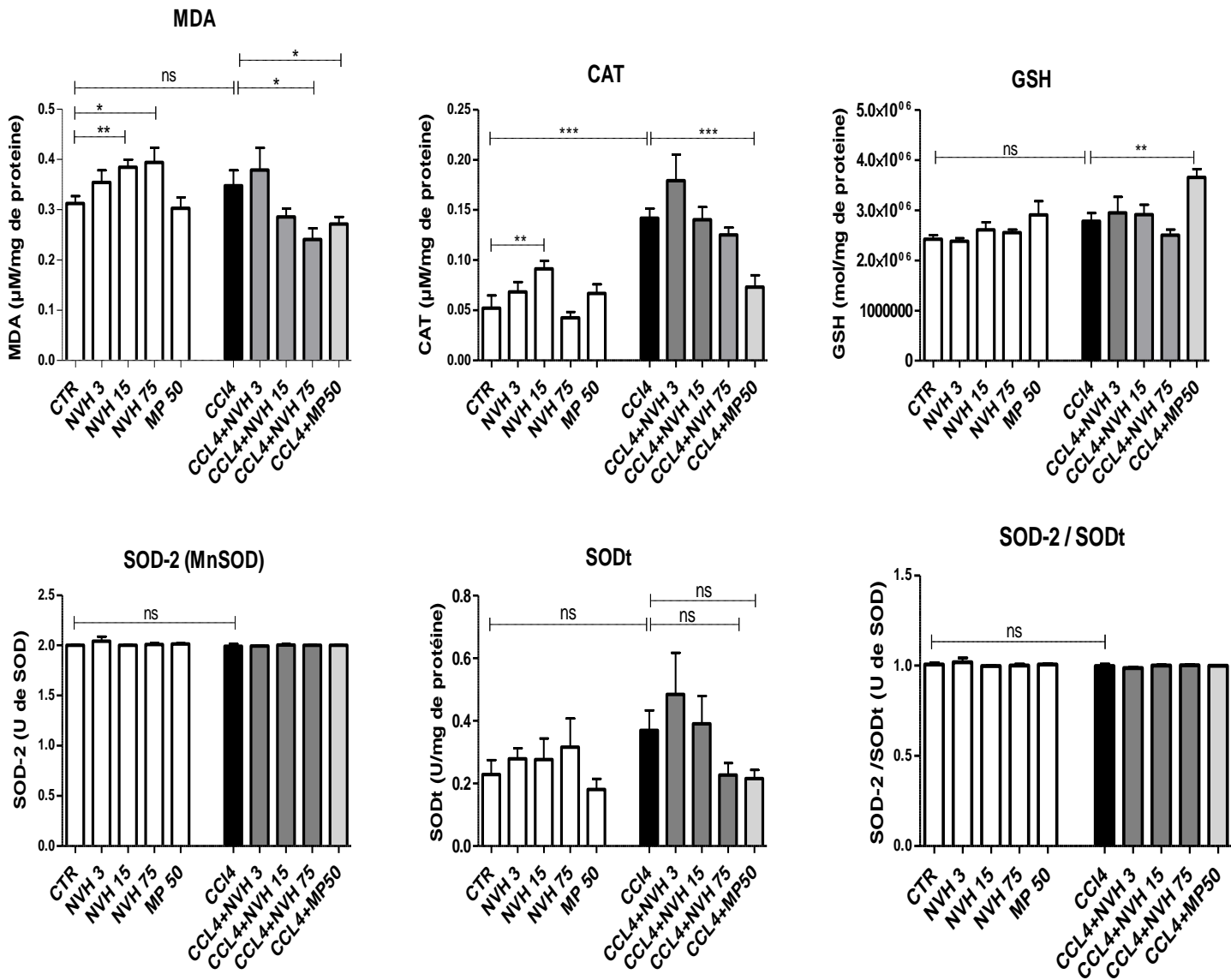


Figure 48 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur la peroxydation lipidique (MDA) et quelques antioxydants

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, MDA : Malondialdéhyde, CAT : catalase, GSH : Glutathion réduit, SOD-2 : Superoxyde dismutase 2, SODt : Superoxyde dismutase totale *p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001, ns : non significatif. n=10. Les barres représentent les moyennes ± ESM

III-7-1-8- Sur l'expression de quelques marqueurs de l'apoptose cellulaire : Bcl-2 et Bax

La figure 49 présente les effets de l'extrait aqueux sur l'expression de Bcl-2 et Bax, deux régulateurs de l'apoptose cellulaire. Comparé aux animaux contrôles, il n'apparaît aucune variation significative de l'expression de Bcl-2 et Bax, chez les animaux traités à l'extrait aqueux ou à la méthylprednisolone uniquement. L'induction de l'hépatite aiguë n'a entraîné aucune variation de l'expression de Bcl-2 et Bax, comparé aux contrôles. Le traitement à l'extrait aqueux avant induction de l'hépatite a entraîné comparé aux contrôles CCl₄, une diminution significative ($p < 0,05$) de Bcl-2 (38%) à la dose de 15 mg/kg et une diminution significative ($p < 0,05$) de Bax aux doses de 15 mg/kg (54%) et 75 mg/kg (35%). Aucune variation significative de Bcl-2 n'a été notée aux doses de 3 mg/kg et 75 mg/kg. Le traitement à la méthylprednisolone a entraîné une diminution significative ($p < 0,01$) de Bcl-2 (55%) et du rapport Bcl-2/Bax (36%), comparé aux contrôles CCl₄. Aucune variation significative de l'expression de Bax n'a été notée.

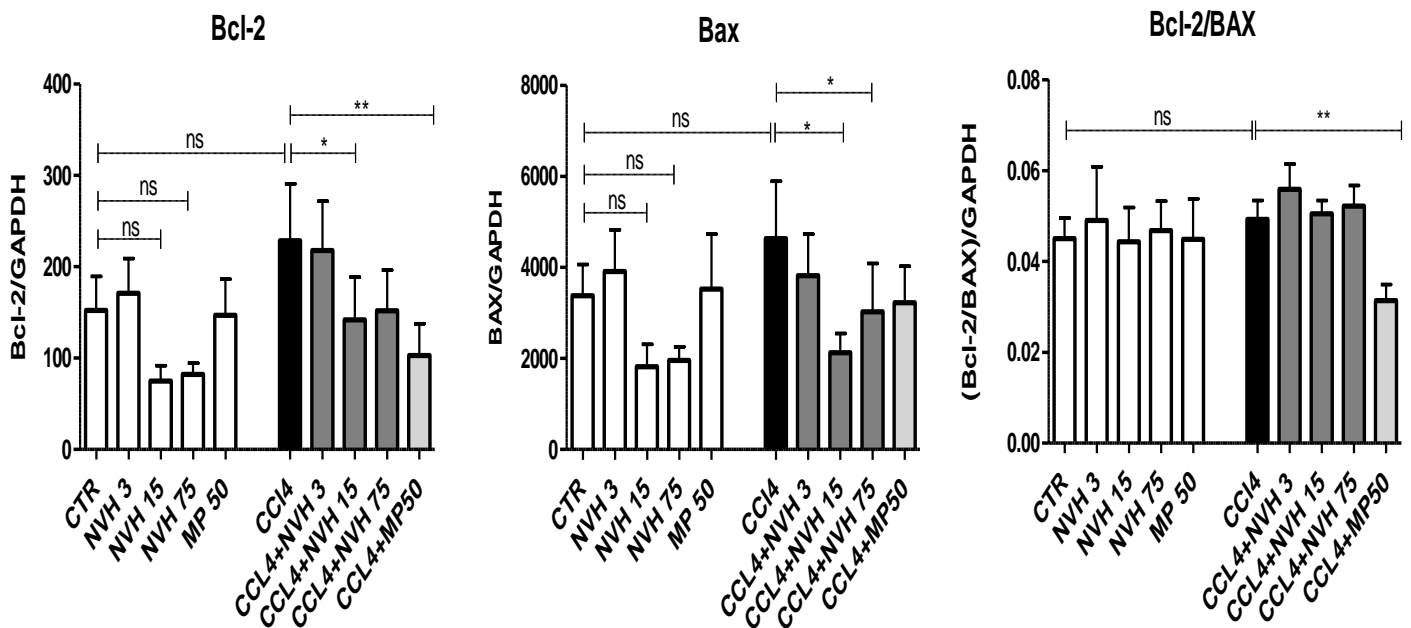


Figure 49 : **Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur Bcl-2 et Bax.**

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, CCl₄ : Tétrachlorure de carbone, Bcl-2 : « B-cell lymphoma 2 », Bax : « Bcl-2 associated X protein » * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns : non significatif. n=10. Les barres représentent les moyennes \pm ESM

III-7-2- EFFETS PREVENTIFS SUR L'HEPATITE AIGUE INDUITE PAR LA CONCANAVALIN A (ConA)

III-7-2-1- Sur les transaminases sériques

Les effets de l'extrait aqueux ont été évalués sur les transaminases sériques après induction de l'hépatite aiguë à la Concanavalin A. L'injection intraveineuse de la ConA a entraîné après 8 heures, une augmentation significative ($p < 0,001$) des taux sériques d'ASAT (14 fold) et ALAT (29 fold), comparé aux animaux contrôles. Le traitement à l'extrait aqueux avant induction de l'hépatite a entraîné, en comparaison aux contrôles traités à la Concanavalin A, une diminution non significative d'ASAT (23%) et d'ALAT (19%) à la dose de 75 mg/kg. Le traitement à la méthylprednisolone a entraîné, une diminution significative ($p < 0,01$) de l'ASAT (39%) et de l'ALAT (38%), comparé aux contrôles ConA (Figure 50A). En outre, une corrélation positive et significative ($p < 0,0001$) a été notée entre les taux de l'ASAT et de l'ALAT (Figure 50B).

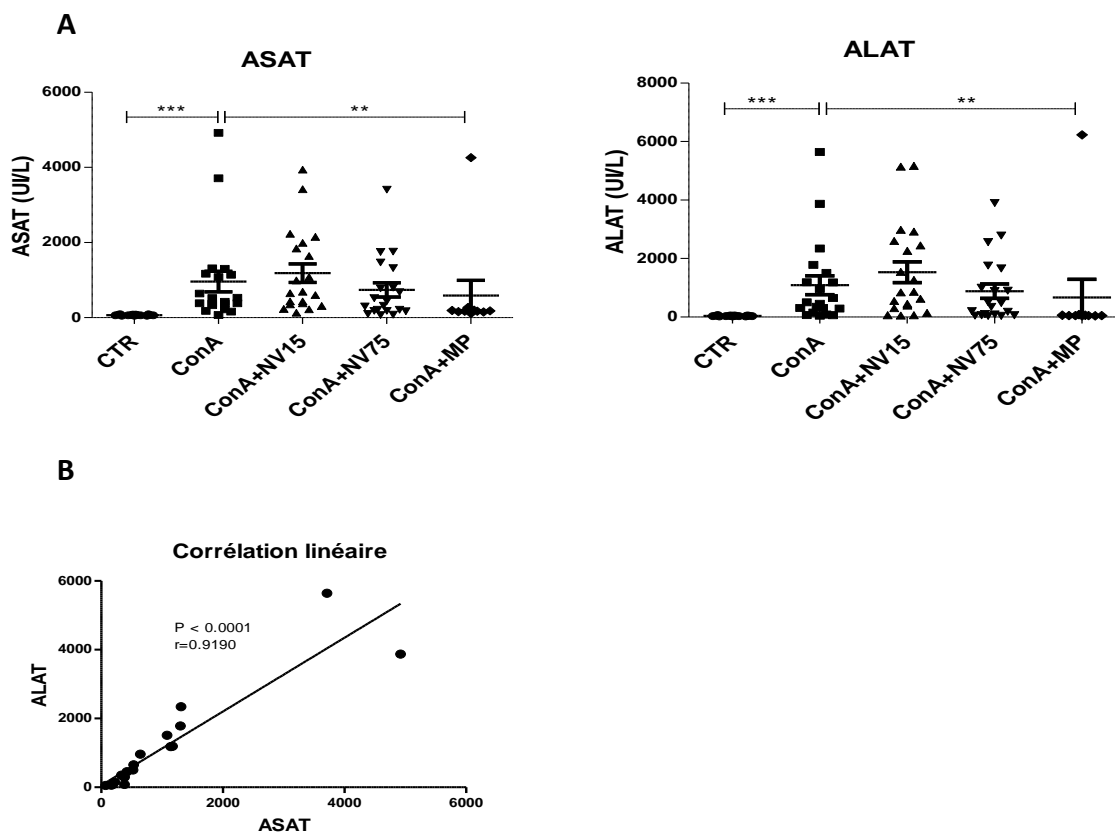


Figure 50 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur les transaminases sériques après injection de la ConA.

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, ConA : Concanavalin A, ASAT : Aspartate aminotransférase, ALAT : Alanine aminotransférase, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n \geq 10$. Chaque point sur le graphique représente la valeur pour un animal. Les barres entre les points représentent les ESM.

III-7-2-2- Sur les lésions hépatiques induites par la Concanavalin A

Les effets du traitement à l'extrait aqueux ont été observés sur les lésions hépatiques induites par la Concanavalin A. L'injection intraveineuse de la Concanavalin A, a entraîné après 8 heures, des lésions nécrotiques localisées soit dans le tissu hépatique (Figure 51B et D) soit autour des veines centrolobulaires (Figure 51C et E), comparé aux animaux contrôles présentant un foie sain (Figure 51A). Comparé aux contrôles ConA, le traitement à l'extrait aqueux à 15 mg/kg n'a entraîné aucune réparation hépatique, tant il a été observé des lésions nécrotiques à cette dose. Par contre, à la dose de 75 mg/kg, il a été noté très peu ou pas de lésions nécrotiques. Sous traitement à la méthylprednisolone il n'a été observé aucune lésion hépatique, comparé aux contrôles ConA.

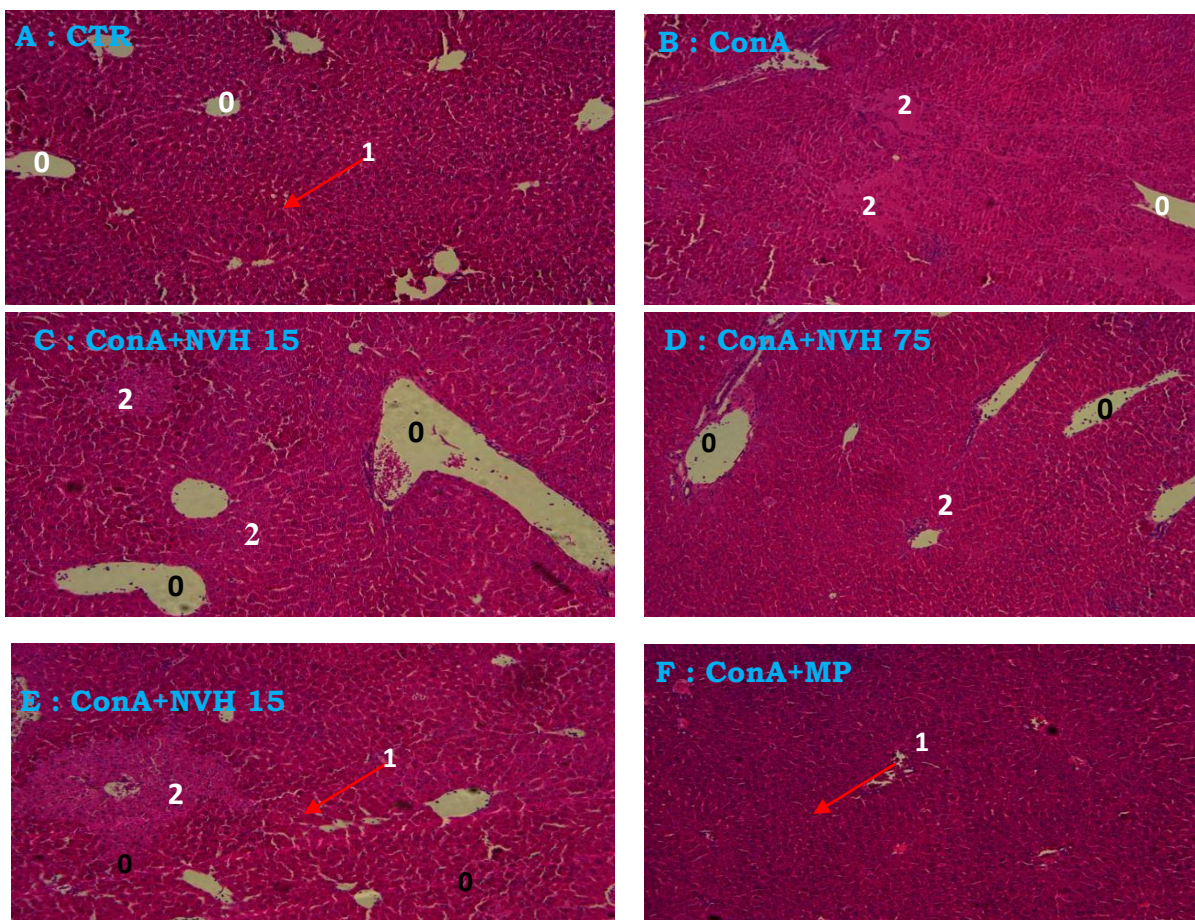


Figure 51 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux sur les lésions hépatiques induites par la Concanavalin A (HE x 100)

A : Foie normal avec les veines centrolobulaires (0) et les hépatocytes (1), B : Foie des souris traitées à la ConA, présence des lésions (2), C et E : Foie des souris traitées à l'extrait à 15 mg/kg, présence des lésions (2), D : Foie des souris traitées à l'extrait à 75 mg/kg, présence des lésions (2), F : Foie des souris traitées à la méthylprednisolone, absence de lésions. CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, ConA : Concanavalin A, MP : Méthylprednisolone, CV : Veine centrolobulaire, L : lésions. Veine centrolobulaire (0), Hépatocytes (1), Lésions (2).

III-7-2-3- Sur l'expression de quelques cytokines pro-inflammatoires

La figure 52 illustre les effets de l'extrait aqueux sur l'expression de quelques cytokines pro inflammatoires après induction de l'hépatite aiguë à la Concanavalin A. En comparaison aux contrôles, il ressort 8h après injection de la Concanavalin A, une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'expression de $TNF\alpha$ (117 fold), $IL1-\beta$ (9 fold), $IFN\gamma$ (289 fold) et $IL-6$ (17 fold). En comparaison aux contrôles ConA, le traitement à l'extrait aqueux avant induction de l'hépatite n'a pas significativement protégé les animaux ; étant donné qu'il n'a été noté que 20% de diminution de $TNF\alpha$ à la dose de 75 mg/kg et 20% de diminution de l' $IL-1\beta$ à la dose de 15 mg/kg. De plus, il n'a été observé aucune diminution significative de l'expression de l' $IL-6$ et $IFN\gamma$ sous traitement à l'extrait aqueux. Le traitement préventif à la méthylprednisolone a conduit à une diminution significative de $TNF\alpha$ ($p < 0,001$; 78%), $IL-1\beta$ ($p < 0,001$; 76%), $IFN\gamma$ ($p < 0,01$; 54%) et $IL-6$ ($p < 0,001$; 71%), comparé aux contrôles ConA.

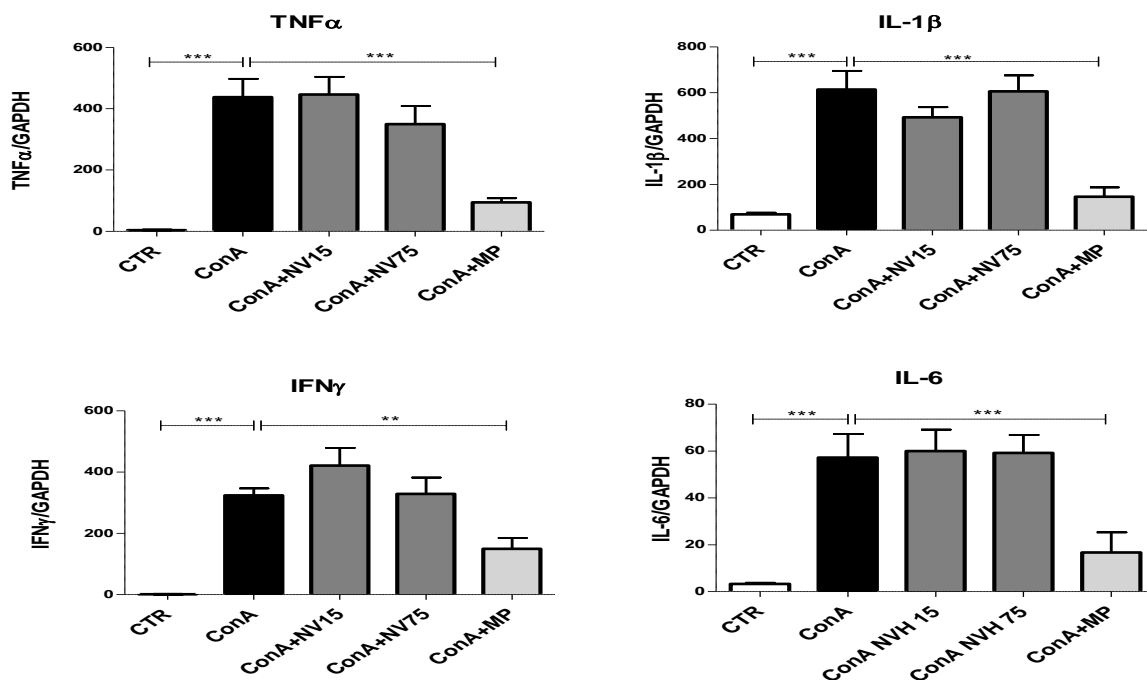


Figure 52 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur le $TNF\alpha$, $IL1-\beta$, $IFN\gamma$ et $IL-6$ après induction de l'hépatite à la ConA.

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, ConA : Concanavalin A, $TNF\alpha$: Tumor Necrosis Factor alpha, $IL-1\beta$: Interleukine-1 beta, $IFN\gamma$: Interferon gamma, $IL-6$: Interleukine 6, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n \geq 10$. Les barres représentent les moyennes \pm ESM

III-7-2-4- Sur le malondialdéhyde (MDA), la catalase (CAT), le glutathion réduit (GSH) et les superoxydes dismutases

La figure 53 montre les effets de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur le MDA, la Catalase (CAT), le GSH, la SOD-2 et la SOD totale. Il n'y apparaît aucune variation significative de la SOD-2 et la SOD totale entre les différents groupes et quelques soient les conditions. Comparé aux contrôles, l'induction de l'hépatite aiguë à la ConA, a entraîné une augmentation significative du MDA ($p < 0,01$; 1,9 fold), de la catalase ($p < 0,05$; 3 fold) et du GSH ($p < 0,01$; 2 fold). Le traitement à l'extrait aqueux avant induction de l'hépatite a entraîné comparé aux contrôles, une diminution significative du MDA ($p < 0,01$; 37%), une diminution significative de la GSH ($p < 0,05$; 24%) et une diminution non significative de la catalase à la dose de 75 mg/kg. Il n'a été noté aucune variation significative du MDA, de la catalase et du GSH à la dose de 15 mg/kg. Le traitement à la méthylprednisolone avant induction de l'hépatite a entraîné une diminution significative du MDA ($p < 0,05$; 36%), de la catalase ($p < 0,05$; 52%) et du GSH ($p < 0,001$; 46%), comparé aux contrôles ConA.

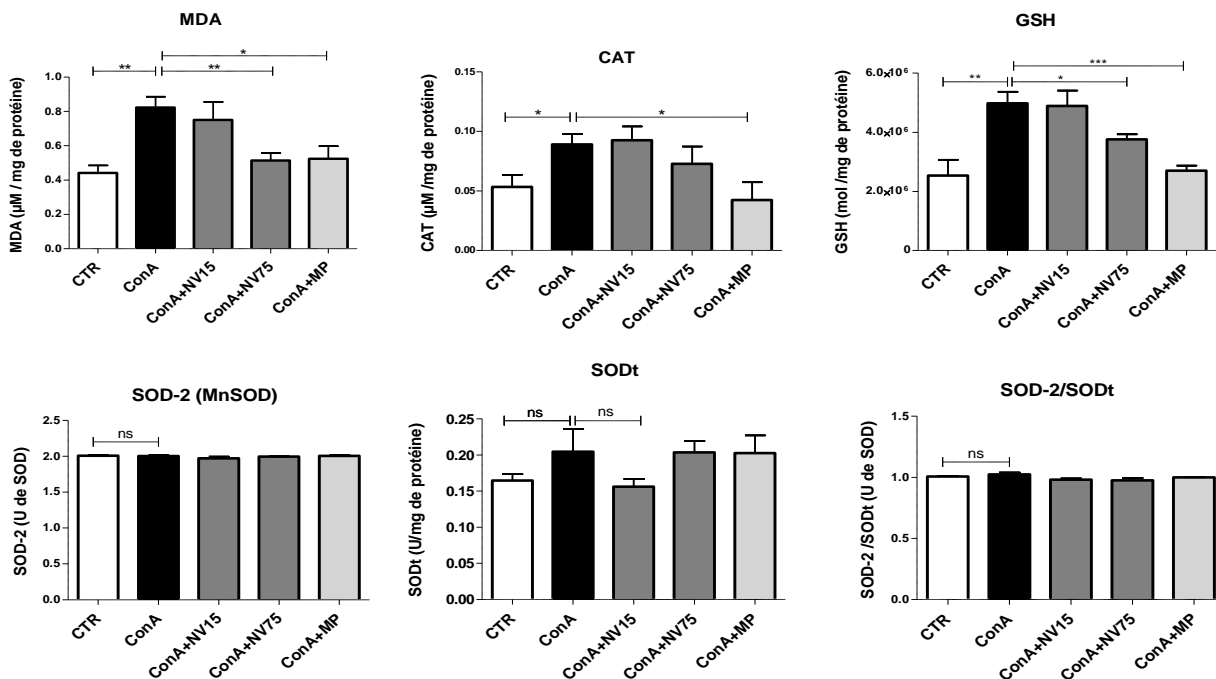


Figure 53 : Effets en traitement préventif de l'extrait aqueux de *N. velutina* sur la peroxydation lipidique (MDA) et quelques antioxydants après injection de la ConA

CTR : contrôle, NVH : extrait aqueux, ConA : Concanavalin A, MDA : Malondialdéhyde, CAT : catalase, GSH : Glutathion réduit, SOD-2 : Superoxyde dismutase 2, SOD totale : Superoxyde dismutase totale ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n \geq 10$. Les barres représentent les moyennes \pm ESM

CHAPITRE IV : DISCUSSION

Neoboutonia velutina Prain est une plante de la famille des Euphorbiacées. Elle est utilisée en médecine traditionnelle camerounaise pour traiter les affections du foie comme l'hépatite. Cependant, aucune étude scientifique n'a été reportée sur l'éventuelle efficacité de *Neoboutonia velutina* contre les hépatites. En tenant compte de l'utilisation traditionnelle de cette plante, nous avons entrepris d'évaluer son efficacité contre les hépatites et ainsi, documenter les assertions du « médecin » traditionnel de qui nous tenons les informations sur la plante. Après identification de l'espèce récoltée, nous avons préparés différents extraits des écorces de *Neoboutonia velutina* : un extrait à l'éthanol qui mime la préparation traditionnelle et un extrait à l'eau qui vise à simplifier la préparation au maximum avec pour objectif, avoir un extrait plus accessible. En s'appuyant sur les données de la littérature, ce chapitre présente les différentes explications possibles des résultats obtenus dans cette étude.

Les analyses phytochimiques qualitative et analytique des extraits de *N. velutina* (éthanolique et aqueux) ont été réalisées dans le but de mettre en évidence les composés supposés bioactifs dans ces extraits. Nos résultats ont révélé dans l'extrait éthanolique, une présence majoritaire des composés lipidiques tels que les stérols et polyterpènes et dans l'extrait aqueux une présence majoritaire des saponines et des composés glucidiques tels que les glycosides. Nous avons également noté l'absence des polyphénols totaux, des alcaloïdes et des flavonoïdes, associés à un pouvoir réducteur de fer quasiment nul. Cependant, comme dans plusieurs plantes médicinales [197]–[202], nous avons noté la présence des composés anti-radicalaires. Mais paradoxalement, bien que l'extrait à l'éthanol semble être le plus intéressant des deux extraits, il a été observé une faible capacité antioxydante totale des deux extraits. Les composés anti-radicalaires mis en évidence semblent ainsi ne pas être des polyphénols comme couramment rencontrés dans les plantes [203]–[206] puisque l'absence de ce groupe de composés a été notée dans ces extraits. Sachant que les composés phénoliques exercent leur activité antioxydante via deux principaux mécanismes : comme donneur d'atome d'hydrogène ou comme chélateur de métaux [197], [207] ; l'absence de polyphénols totaux dans nos extraits est en adéquation avec leur très faible capacité à réduire le fer et leur faible capacité antioxydante totale. Ceci d'autant plus que nos extraits se sont avérés ne pas être des réducteurs de fer, considérés comme de puissants antioxydants [208].

Toutefois, il est connu que le potentiel antioxydant des plantes fait intervenir trois dimensions plus ou moins liées: la capacité anti-radicalaire (piégeurs des radicaux libres), la capacité à chélater les métaux (chélateurs de métaux) et la capacité à augmenter l'activité des enzymes antioxydantes endogènes [209]. Le faible pouvoir antioxydant total en contraste avec l'intéressante capacité à piéger les radicaux libres, permet ainsi de classer nos extraits parmi les piégeurs de radicaux libres. Ces extraits seraient donc plus piégeurs de radicaux libres (anti-radicalaires) que stimulants des antioxydants endogènes ou chélateurs de métaux.

Par ailleurs, si les polyphénols ne sont pas le groupe de composés responsables de l'activité anti-radicalaire de nos extraits, celle-ci serait due aux saponines contenues dans l'extrait aqueux ou aux stérols retrouvés dans l'extrait éthanolique. Tant il a été reconnu plusieurs propriétés pharmacologiques aux saponines : des propriétés antioxydante, anti-carcinogénique, anti-inflammatoire, antivirale... [210] [211] [212]. De même qu'il a été reconnu des propriétés antioxydante et hypocholestérolémiantes aux stérols des végétaux [213] [214].

Les analyses phytochimiques des extraits de *N. velutina* avaient également pour but de révéler la présence d'éventuels groupes de composés toxiques dans nos extraits afin d'évaluer leur degré de toxicité. En effet, ces dernières années, malgré l'absence de données scientifiques rigoureuses, l'utilisation des plantes médicinales a connu une expansion considérable, gagnant même en popularité dans les pays développés. Cette expansion dans l'utilisation des plantes médicinales, peut s'expliquer par l'idée populaire selon laquelle les plantes médicinales sont totalement inoffensives puisque qu'étant des produits naturels, contrairement aux biomédicaments [215]. Cependant, comme rapporté dans la littérature [216]–[219], les plantes médicinales peuvent induire une toxicité, si elles sont utilisées de façon inadéquate. Néanmoins, la croyance populaire au sujet des plantes médicinales exprime un réel besoin de se soigner avec des produits les plus inoffensifs possible ; d'où l'importance de réaliser des études de toxicité en complément ou en amont de l'étude des propriétés pharmacologiques d'une plante médicinale.

Dans notre travail, pour apprécier le degré de toxicité des extraits de *N. velutina*, nous avons entrepris de dresser leur profil toxicologique. C'est ainsi que nos résultats ont révélé une très faible cytotoxicité de l'extrait aqueux (taux de LDH cellulaire inférieure à 1%) et une cytotoxicité moyenne de l'extrait éthanolique (LDH cellulaire de 7% maximum). L'extrait aqueux de *N. velutina* semble ainsi être

l'extrait le moins cytotoxique. De plus, nous avons noté un effet antiprolifératif de l'extrait aqueux quelque soit l'état synchronisé ou non des cellules utilisées. Tandis que l'extrait à l'éthanol a présenté un effet prolifératif sur cellules non synchronisées et antiprolifératif sur cellules synchronisées ; ce résultat suggère un effet antiprolifératif de l'extrait aqueux indépendamment du stade de division de la cellule tandis que l'effet de l'extrait éthanolique serait fonction du stade de la division cellulaire. Par contre, il n'a été noté aucun effet des extraits sur l'apoptose cellulaire. Ainsi, bien qu'ayant un effet antiprolifératif, nos extraits ne semblent pas induire l'apoptose cellulaire. Par ailleurs, l'effet antiprolifératif de l'extrait aqueux pourrait être associé à la présence des saponines dans celui-ci, étant donné que plusieurs études ont reporté un effet antiprolifératif des saponines sur des souches cellulaires cancéreuses [220]–[222].

En outre, chez la souris, après administration de l'extrait aqueux, nous avons noté une seule souris morte à la plus forte dose (5000 mg/kg) soit une mortalité globale de 3,3 % après 7 jours d'observation ; ce qui traduit une DL50 supérieure à 5000 mg/kg. Se rapportant aux critères de Hodge et Steiner [190], nous pouvons dire que l'extrait aqueux de *N. velutina* est faiblement toxique car selon ces auteurs, toute substance dont la DL50 est supérieure à 5 g/kg, est considérée comme faiblement toxique tandis que toute substance dont la DL50 est inférieure à 5 g/kg, est considérée comme hautement toxique. Cette DL50 supérieure à 5000 mg/kg est en droite ligne avec la toxicité inférieure à 1% notée sur les cellules. Nous avons néanmoins noté une diminution du poids relatif du foie des animaux mâles traités à l'extrait aqueux. Cette diminution rejoindrait l'effet antiprolifératif observé sur les cellules. Pour ce qui est de l'extrait à l'éthanol, une mortalité globale de 35 % a été notée pour une administration de l'extrait jusqu'à la dose de 1000 mg/kg. Mais une mortalité de 50% a été observée à la dose de 500 mg/kg. Ainsi, la dose de l'extrait éthanolique entraînant 50% de mortalité des animaux (DL50), serait de 500 mg/kg. Selon les critères cités plus haut, l'extrait éthanolique de *N. velutina* serait fortement toxique. De plus, il a été noté une hépatomégalie chez les mâles traités à l'extrait éthanolique. Cette observation rejoint l'effet prolifératif observé sur les cellules après administration de l'extrait éthanolique et témoignerait d'un hyperfonctionnement du foie. Par ailleurs, les femelles semblent être protégées contre ces effets antiprolifératif (extrait aqueux) et/ou prolifératif (extrait éthanolique) de nos extraits, ce qui pourrait s'expliquer par la différence hormonale entre les deux sexes.

Après avoir dressé les profils phytochimique et toxicologique de nos extraits, nos premières investigations sur l'évaluation de leur efficacité ont porté sur les cellules du carcinome hépatocellulaire. Nous avons noté que le traitement des cellules HepG2 avec l'extrait aqueux, immédiatement après stimulation des cellules ou dans les 6h qui suivaient la stimulation, potentialisait l'effet pro-inflammatoire de l'agent inducteur de l'inflammation. Tandis que le traitement à l'extrait 24h après la stimulation, entraînait un effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux. Par contre, sur les cellules HepaRG différenciées en hépatocytes, le traitement à l'extrait immédiatement après stimulation des cellules, était associé à une tendance anti-inflammatoire de l'extrait. Ces résultats suggèrent que le temps de traitement optimal pour l'obtention d'un effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux est de 24h après induction de l'inflammation. Toutefois, il apparaît que ce temps pourrait être dépendant du type cellulaire inflammé puisqu'il est considérablement diminué sur les cellules HepaRG différenciées en hépatocytes. Cette différence d'effet entre les HepG2 et les HepaRG, s'expliquerait par la différence fonctionnelle entre les deux lignées cellulaires. Plusieurs études ont en effet reporté que les cellules HepaRG différenciées en hépatocytes étaient fonctionnellement plus proches des hépatocytes primaires humains, que ne le sont les HepG2. Elles mimeraient donc mieux ce qui se passe dans l'organisme entier puisque possédant toute la batterie enzymatique nécessaire [174], [223]–[227].

Par ailleurs, sur les HepaRG, nous avons noté contrairement aux HepG2, une up-régulation de l'expression de l'IL-8 après traitement à l'extrait aqueux. Ce résultat suggère que l'effet de l'extrait aqueux sur l'expression hépatique de l'IL-8 serait fonction de la phase de l'inflammation. Ainsi, lors de la première phase de l'inflammation, l'extrait aqueux entraînerait une augmentation de l'expression de l'IL-8 pour induire la prolifération des hépatocytes et réparer la lésion. Par contre, après installation de l'inflammation, il entraînerait plutôt une down-régulation de l'IL-8 pour stopper l'inflammation. En effet, IL-8 est décrit comme étant une cytokine pro-inflammatoire durant l'hépatite chronique [228] [229] et serait délétère lors d'un cancer hépatocellulaire [230] tandis que IL-8 serait chémoattractant, mitogénique et anti-apoptotique durant l'inflammation aiguë [231]. IL-8 est donc important pour induire la prolifération hépatocytaire, faciliter la réparation et la régénération hépatique [232]–[234], ce qui expliquerait l'augmentation de son expression après traitement des HepaRG à l'extrait aqueux. En outre, nous avons noté que l'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux sur les hépatocytes était

semblable à celui de la dexaméthasone, décrit comme atténuant l'hépatite induite par la lipopolysaccharide [235] et efficace à court terme contre un épisode d'inflammation aiguë au cours d'une hépatite chronique [236].

Pour ce qui est de l'extrait à l'éthanol, nos résultats ont révélé un profil pro-inflammatoire de cet extrait avec ou sans inflammation induite, exception faite, lors du co-traitement où il a été noté un effet anti-inflammatoire de cet extrait administré à 50 µg/mL. Ce résultat suggère que l'effet anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique, sans être concentration dépendant, n'est obtenu qu'à une concentration bien précise de l'extrait administré durant la première phase de l'inflammation. Cela s'expliquerait par la nécessité d'atteindre une concentration bien précise des composés responsables de cet effet anti-inflammatoire ; concentration au-delà ou en deçà de laquelle des composés toxiques seraient majoritaires, masquant l'effet des composés aux propriétés anti-inflammatoires. Ainsi, l'effet pro-inflammatoire des deux extraits à certaines concentrations serait dû à l'accumulation des composés toxiques au détriment de ceux aux propriétés anti-inflammatoires.

Après l'étude sur les cellules, nos investigations ont porté sur les effets d'une administration curative de nos extraits dans un modèle d'hépatite aiguë induite par le CCl₄ chez la souris. Le modèle d'hépatite au CCl₄ est un modèle expérimental très couramment utilisé pour évaluer l'effet hépatoprotecteur d'un médicament [237]. Le CCl₄ utilisé exerce son action hépatotoxique à travers le cytochrome P450 2E1(CYP2E1) et après sa bioactivation conduisant au radical CCl₃[°] très réactif puis au radical CCl₃OO[°] encore plus destructeur [238], [167], [239], [240]. Ce modèle d'hépatite au CCl₄ est caractérisé par la production de radicaux libres qui initient la peroxydation lipidique accompagnée d'une production des médiateurs pro-inflammatoires [241].

Dans notre étude sur les effets curatifs de nos extraits, l'injection de CCl₄ a entraîné une augmentation de l'expression de TNF α , IL1- β , IL-6, Cox-2 et iNOS, accompagnée d'une augmentation des transaminases (ASAT et ALAT) associée aux lésions hépatiques. De plus, le CCl₄ a induit une up-régulation des chimiokines CXCL-1/KC, CXCL-2/MIP-2, CXCL-5/Lix et leur récepteur CXCR-2 ; ainsi qu'une diminution de l'expression de la Catalase et du glutathion peroxydase. L'administration d'une dose unique de l'extrait aqueux a provoqué une diminution des transaminases sériques et des chimiokines précédemment évoquées ; de même

qu'une légère diminution de l'expression de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1-}\beta$, IL-6 , Cox-2 et iNOS . Toutefois, il n'a pas été noté un effet de l'extrait sur l'expression des antioxydants comme la SOD-1 , la SOD-3 , la GPX-1 ou la Catalase, ni une réparation des lésions hépatiques. Par contre, une double administration de cet extrait aqueux a révélé une diminution des transaminases, associée à une diminution du malondialdéhyde (MDA) et des nitrites, une augmentation de l'activité de la SOD totale et une réparation des lésions hépatiques. La diminution du taux de MDA témoigne de l'effet de l'extrait contre la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres. Toutefois, ces résultats traduisent globalement un faible effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux suite à une administration unique et un effet hépatoprotecteur plus important après une double administration. En outre, il est noté une tendance de l'extrait aqueux à être plus efficace aux doses faibles avec une dose efficace différente en fonction de la souche de souris utilisée (75 mg/kg chez les C57BL/6 et 37,5 mg/kg chez les BALB/C). Cette observation qui reste en accord avec celle faite sur les cellules suggère une nécessité d'avoir une concentration bien précise de composés hépatoprotecteurs pour obtenir une efficacité.

Par ailleurs, l'administration en curatif d'une double dose d'extrait à l'éthanol a entraîné une très forte mortalité des animaux traités à l'extrait éthanolique avec ou sans induction de l'hépatite. Cette mortalité qui a atteint 100% à la plus forte dose d'extrait (150 mg/kg), était accompagnée d'une explosion des transaminases sériques chez les survivants. Cette forte mortalité rejoint celle observée lors de l'étude de la toxicité aiguë et rappelle l'effet potentialisateur de cet extrait sur les cellules. Ainsi, ces résultats démontrent une réelle toxicité de l'extrait éthanolique aux doses étudiées. Ce qui suggère que les doses choisies pour évaluer l'effet de l'extrait éthanolique dans cette étude sont très fortes. Au regard du profil phytochimique de l'extrait éthanolique, cette toxicité pourrait être due aux diterpènes contenus dans cet extrait. Très souvent retrouvés chez les Euphorbiacées, les diterpènes qui font partie du grand groupe des polyterpènes, sont réputés toxiques [47], [53].

Cependant, parmi les esters diterpéniques retrouvés chez les Euphorbiacées, il a été distingué trois groupes : un groupe regroupant les esters de phorbols et ingénol, considérés toxiques sans possibilité d'effet médicinal. Un autre groupe constitué de composés présentant une toxicité mais qui, aux doses adéquates, présentent une perspective thérapeutique. Un dernier groupe regroupant les diterpènes non phorboïdes n'ayant pas ou très peu d'effet toxique et présentant une

activité biologique intéressante [59]. Dans le même ordre d'idée, certains auteurs ont rapporté que, outre leur toxicité, les esters de phorbol pouvaient induire de remarquables effets thérapeutiques à des doses exceptionnellement faibles [53]. Dans notre étude, au regard de l'effet anti-inflammatoire observé à la concentration de 50 µg/mL sur les cellules et compte tenu des propriétés anti-radicalaires de l'extrait éthanolique, ce dernier pourrait contenir des esters diterpéniques classés dans le second groupe. Ainsi, en diminuant drastiquement les doses étudiées dans cette étude (doses infinitésimales), il serait possible de diminuer l'effet toxique de cet extrait tout en révélant ses propriétés thérapeutiques. Cette dernière hypothèse sur l'effet thérapeutique de notre extrait à l'éthanol, est en concordance avec la posologie indiquée par le « médecin » traditionnel qui préconise une macération ex tempore de la poudre d'écorce dans du vin de palme avant administration. Cette méthode de préparation de l'extrait limiterait la libération des composés toxiques.

Au regard des profils phytochimique, toxicologique et thérapeutique des deux extraits, à dose égale, l'extrait aqueux est apparu comme étant le moins toxique des deux extraits avec une bonne capacité anti-inflammatoire et un intéressant pouvoir anti-radicalaire. L'extrait éthanolique a quant à lui, présenté un profil thérapeutique plus intéressant avec une capacité anti-inflammatoire à une concentration précise (50 µg/mL) et un pouvoir anti-radicalaire plus important que celui de l'extrait aqueux. Seulement, aux doses et concentrations étudiées, l'extrait éthanolique a présenté une forte toxicité sur les cellules comme chez la souris. Pour exploiter le potentiel thérapeutique de cet extrait éthanolique et assurer son utilisation sécurisée, il est primordial de mieux caractériser et circonscrire sa toxicité. Pour cela, des mises au point de cet extrait sont nécessaires. Dans le cadre de cette étude, en termes de bénéfice-risque, l'extrait aqueux semble être le meilleur de deux extraits, compte tenu de sa faible toxicité. C'est donc que, la priorité a été accordée à l'extrait aqueux pour le fractionnement et l'évaluation des effets préventifs.

Les effets préventifs de l'extrait aqueux de *N. velutina* ont ainsi été évalués suivant deux modèles d'hépatite : un modèle d'hépatite aiguë au CCl₄ et un modèle d'hépatite aiguë à la Concanavalin A.

Le modèle d'hépatite au CCl₄ comme mentionné précédemment est un modèle d'hépatite radicalaires-libres dépendant, couramment utilisé. Il est caractérisé par une production de radicaux libres responsables des lésions hépatiques. Ces radicaux libres initient la peroxydation lipidique et entraînent l'activation des cellules de

küpfher accompagnée d'une production de médiateurs pro inflammatoires [242]. Outre la production des médiateurs pro inflammatoires, plusieurs études ont reporté une augmentation des transaminases sériques lors d'une hépatite au CCl₄ [243]–[247]. Dans notre étude préventive, nos résultats ont révélé dans le modèle CCl₄, une augmentation des transaminases sériques accompagnée d'une up-régulation de l'expression de TNF α , IL-1 β , IL-6 et COX-2, après injection du CCl₄. Le prétraitement à l'extrait aqueux a entraîné une normalisation de ces paramètres pro-inflammatoires avec une diminution remarquable des transaminases sériques. En droite ligne avec les résultats de l'étude curative et ceux de l'étude sur les cellules HepG2, (diminution de l'expression du TNF α et de l'IL-8 des HepG2), la normalisation de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires après administration de l'extrait aqueux suggère un effet anti-inflammatoire hépatique de cet extrait aqueux comme reporté pour d'autres plantes de la famille des Euphorbiacées [29], [36], [37], [248], [249]. De plus, au cours d'une hépatite aiguë, le taux des transaminases sériques est considéré comme un biomarqueur de la fonction hépatique [250] et un important indicateur de la sévérité des lésions hépatiques aiguës et donc de la destruction des hépatocytes [241], [251], [252]. La remarquable diminution du taux d'ASAT et d'ALAT observée chez les animaux sous prétraitement à l'extrait aqueux suggère un rôle protecteur de cet extrait contre les lésions induites par le CCl₄ et donc contre la destruction des hépatocytes. Cette diminution du taux de transaminases est en adéquation avec les réparations hépatiques observées dans le foie des animaux prétraités à l'extrait aqueux et rappelle la diminution des transaminases après une administration unique ou double de cet extrait aqueux (étude curative).

Par ailleurs, pour comprendre les processus qui soutendent l'action hépatoprotectrice de l'extrait aqueux dans ce modèle CCl₄, l'expression de quelques chimiokines et facteurs de croissance a été étudié et un marquage de la prolifération cellulaire a été réalisé. En effet, les chimiokines sont des protéines de faible poids moléculaire avec des fonctions se rapprochant de celles des cytokines. Une up-régulation de leur expression est observée lors d'une lésion tissulaire quelque soit le tissu [253], [254] et leur expression est modulée par plusieurs stimuli incluant les facteurs de croissance, les cytokines et les agents stressants comme les ERO [255]–[258]. Initialement identifiées pour leur habileté à initier la réponse inflammatoire [259], [260], il est à ce jour reconnu aux chimiokines, un rôle dans plusieurs processus physiologiques comme la différenciation, la survie, la

prolifération ou l'apoptose cellulaire, tout comme dans la fibrogénèse, l'angiogénèse vasculaire ou la tumeur métastatique [261]–[268]. Ainsi, ces dernières années, le rôle crucial des chimiokines a été démontré au cours des maladies hépatiques aiguë et chronique [253].

Dans notre étude, l'induction de l'hépatite au CCl₄ a conduit à une up-régulation des chimiokines CXCL-1/KC (effet curatif), CXCL-2/MIP-2, CXCL-5/Lix et leur récepteur CXCR-2. Cette up-régulation était accompagnée d'une augmentation de l'expression des facteurs de croissance TGFβ et PDGF B (modulateurs de l'expression des chimiokines) dans l'étude préventive et serait consécutive à la production des radicaux libres. Ces radicaux libres issus de la bioactivation du CCl₄, seraient les déclencheurs de la cascade de réactions conduisant à la production des cytokines pro-inflammatoires et donc aux chimiokines. Cependant, l'injection de CCl₄ n'a pas entraîné une augmentation de l'expression du facteur de croissance HGF ou de la chimiokine CXCL-1/KC (étude préventive). Toutefois, l'administration de l'extrait aqueux a normalisé l'expression de CXCL-1/KC (effet curatif), CXCL-2/MIP-2, CXCL-5/Lix, CXCR-2, TGFβ et PDGF B mais aucune variation de l'expression du HGF ni celle de CXCL-1/KC n'a été notée en administration préventive.

Appartenant à la famille des chimiokines CXC ; CXCL-1/KC, CXCL-2/MIP-2, CXCL-5/Lix et leur récepteur CXCR-2 sont connus pour leur capacité chimioattractive des neutrophiles sur le site de lésions. Au cours des maladies hépatiques, suite à l'action de CXCL-1/KC, CXCL-2/MIP-2, CXCL-5/Lix et leur récepteur CXCR-2, une accumulation des neutrophiles sur le site de lésions a été associée à une exacerbation des lésions hépatiques [96], [269]. Ainsi, dans notre étude, la normalisation de l'expression de CXCL-1/KC (curatif), CXCL-2/MIP-2, CXCL-5/Lix et CXCR-2 par l'extrait aqueux, témoigne de la capacité protectrice de celui-ci. Tant il a été démontré qu'un faible taux de chimiokines CXC avait un rôle hépatoprotecteur et était associé à la réparation et la régénération hépatique, contrairement à un taux élevé qui serait délétère [254], [258].

Cependant, en traitement préventif, l'effet protecteur de l'extrait aqueux n'était pas associé à une prolifération des hépatocytes comme en témoignent les coupes immunohistochimiques, l'expression du HGF (l'un des plus importants médiateurs de la régénération hépatique), [254], [270] ou l'expression de CXCL-1/KC, l'équivalent de l'IL-8 humain chez la souris [271]. De plus, plutôt que les

hépatocytes, nos résultats ont révélé une prolifération active de cellules autres que les hépatocytes. Une explication à ces résultats serait la capacité de l'extrait à anticiper ou limiter la destruction des hépatocytes comme l'indiquent les transaminases sériques. Ainsi, s'il n'y a pas destruction des hépatocytes, il n'y a pas ou que très peu de nécessité de renouvellement de ceux-ci. Une autre explication pourrait être la capacité de l'extrait à accélérer le processus de réparation. Dans ce dernier cas, les réparations observées dans le foie des animaux sous prétraitement à l'extrait aqueux, seraient en fin de processus de régénération où la prolifération des hépatocytes est arrêtée au profit de la finalisation de la régénération [272], [254]. Les cellules en prolifération actives observées sur les coupes immunohistochimiques pourraient ainsi être les fibroblastes venus combler les lésions pour finaliser la réparation.

Par ailleurs, nos résultats des études préventive et curative chez les souris intoxiquées au CCl₄ n'ont révélé aucun effet du CCl₄ ou de l'extrait aqueux sur l'expression des superoxydes dismutases 1 et 2 (SOD-1, SOD-2), sur l'activité de la superoxyde dismutase totale et l'activité de la superoxyde dismutase 2. Par contre, il a été noté une up-régulation de l'expression de la superoxyde dismutase 3 (SOD-3) après injection du CCl₄ tandis que l'administration de l'extrait aqueux semble avoir anticipé cette up-régulation de la SOD-3. Les superoxydes dismutases étant la première et la plus importante ligne de défense de l'organisme contre le stress oxydatif en général et l'anion superoxyde (O₂⁻) en particulier [124], cette up-régulation de la SOD-3 reflèterait une réaction de défense de l'organisme murin pour se protéger contre la production accrue des ERO (principalement l'anion superoxyde) issus de la bioactivation de CCl₄ [273]–[275]. Toutefois, nos résultats suggèrent en première intention, une incapacité de l'extrait aqueux à stimuler la production des SOD-1 et 2 en réponse au stress oxydatif causé par le CCl₄. Ce qui pourrait s'expliquer par la faible capacité antioxydante totale de l'extrait aqueux ou encore par le caractère aigu de l'expérimentation. Le temps d'expérimentation serait donc très court pour observer une variation notable de ces SODs. Des résultats similaires ont été obtenus en 2013 par Ghaffari et al.[237]. Cependant, il a été noté sous l'effet de l'extrait aqueux, une diminution de l'expression de la SOD-3 après une up-régulation causée par le CCl₄ ; plutôt qu'une incapacité à stimuler toutes les SODs, ce dernier résultat suggère un effet ciblé de l'extrait aqueux sur la SOD-3 qui apparaît comme étant la plus sensible des trois SODs dans notre étude. S'il est vrai que l'importance de la SOD-3 dans la physiologie normale et pathologique du foie

n'est pas encore totalement élucidée, dans sa localisation extracellulaire, la SOD-3 pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'anion superoxyde dans la matrice extracellulaire [273]. L'action de l'extrait anticiperait ainsi sur l'augmentation de la SOD-3 en captant l'anion superoxyde de la matrice extracellulaire, ce qui protégerait les cellules du stress oxydatif dû au CCl₄. Toutefois, des investigations complémentaires permettraient de mieux comprendre l'impact de notre extrait aqueux sur les différentes SODs.

Par ailleurs, il a été démontré que les macrophages issus de la moelle osseuse des souris C57BL/6, comparés à ceux de la moelle osseuse des souris BALB/C, étaient mieux équipés contre le stress oxydatif. Ce qui confère aux C57BL/6 une certaine résistance au stress oxydatif [276]. Ceci, associé au caractère aigu de notre expérimentation, pourrait expliquer l'absence d'effet du CCl₄ sur l'expression des SOD-1 et 2 et laisserait penser à une prédisposition des souris C57BL/6 à contrecarrer la down-régulation des SOD-1 et 2 suite à l'injection du CCl₄. Des études complémentaires sont nécessaires pour une meilleure compréhension de ces résultats qui restent incohérents avec la composition minérale de l'extrait aqueux. En effet, l'analyse de la composition minérale de l'extrait aqueux a révélé la présence des minéraux comme le Zinc (Zn) ou le Manganèse (Mn), qui jouent un rôle hépatoprotecteur avéré et ont un pouvoir antioxydant en étant cofacteur des superoxydes dismutases [277] [126] [278].

Outre le modèle CCl₄, les effets préventifs de l'extrait aqueux ont été évalués dans un modèle Concanavalin A. En effet, le modèle d'hépatite à la Concanavalin A mime l'hépatite auto-immune [168], [169], [279] et est bien établi comme un modèle d'hépatite lymphocytes T dépendant. Il est compté parmi les modèles lymphocytes T les mieux étudiés et est caractérisé par une accumulation des CD4⁺, une implication des cellules de kuppfer et une intervention de plusieurs cytokines parmi lesquelles l'IL-1 β , l'IL-6, IL-12 ou IL-18. Dans ce modèle, les lymphocytes T et les NKT exercent leur effet cytotoxique à travers les cellules hépatiques. Ainsi, en réponse à l'agent toxique, les cellules de kuppfer activées produisent une grande quantité de TNF α qui activera les lymphocytes T et les NKT. Les cellules T activées produisent à leur tour l'IFN γ qui, avec le TNF α induira le stress oxydatif [280]–[282] et les dommages associés.

Dans notre étude, nos résultats ont révélé suite à l'injection de la ConA, une augmentation du taux de malondialdéhyde (MDA), signe d'un stress oxydatif et de

la peroxydation lipidique. Mais, plutôt qu'une diminution comme observé après injection du CCl₄ lors de l'étude curative, il a été noté une augmentation des antioxydants GSH (glutathion réduit) et catalase après injection de la ConA. Par contre, comme précédemment noté avec le CCl₄, aucune variation de l'activité des superoxydes dismutase (SOD totale et SOD-2) n'a été observée entre les différents groupes. Toutefois, l'augmentation des antioxydants en réponse à la ConA, tout comme l'augmentation de la SOD-3 dans le modèle CCl₄, témoigne d'une tentative de l'organisme murin à contrecarrer le stress oxydatif induit par le toxique. Cette réaction correspondrait à la première ligne de défense de l'organisme pour répondre à un stress oxydatif aiguë.

En outre, l'injection de la ConA a provoqué une up-régulation de l'expression de TNF α , IL-1 β , IL-6 et IFN γ , associée à une augmentation des transaminases sériques et l'apparition des lésions hépatiques. L'administration de l'extrait aqueux dans le modèle ConA, n'a entraîné qu'une légère diminution de l'expression de ces paramètres avec une persistance des lésions dans le foie des animaux pré-traités à l'extrait. Toutefois, l'extrait aqueux a induit, une diminution du glutathion réduit et de la catalase et a protégé les animaux contre la peroxydation lipidique induite par la ConA. Ces résultats pris ensemble suggèrent contrairement à ce qui a été observé dans le modèle CCl₄, une faible protection des animaux contre les dommages causés par la ConA. Aux doses étudiées (3, 15 et 75 mg/kg), l'extrait aqueux ne protégerait que très peu contre l'hépatite à la ConA. Cette différence d'efficacité de l'extrait aqueux entre les deux modèles d'hépatite trouverait son explication dans la différence entre les mécanismes d'action des agents inducteurs utilisés dans les deux modèles d'hépatite et suggérerait un effet hépatoprotecteur modèle-dépendant. Une autre explication pourrait être que les doses étudiées ne sont pas celles qu'il faudrait pour observer une efficacité de l'extrait aqueux dans le modèle ConA.

Compte tenu de tous nos résultats et en comparaison avec la méthylprednisolone, une hypothèse de mécanisme d'action de l'extrait aqueux de *N. velutina* pourrait être posée. En effet, la méthylprednisolone est un corticostéroïde utilisé dans la prise en charge de l'hépatite alcoolique [9], [283], [284]. Utilisé comme contrôle positif dans notre étude, nos résultats ont révélé un effet hépatoprotecteur de ce corticostéroïde dans le modèle ConA mais pas dans le modèle CCl₄. Ce qui traduit un effet en sens inverse de notre extrait aqueux. La méthylprednisolone étant décrite comme un immunomodulateur, son efficacité dans le modèle ConA reste en accord avec son mécanisme d'action [106], [285] et

celui de la ConA. Cependant, le contraste d'effet entre la méthylprednisolone et l'extrait aqueux laisse penser que le mécanisme d'action de notre extrait aqueux est différent de celui de la méthylprednisolone. Tandis que la méthylprednisolone agit en modulant la réponse immunitaire impliquée dans le modèle ConA, l'effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux passerait par son action anti-radicalaire. De ce point de vue, le faible effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux dans le modèle ConA n'est pas très surprenant car, en ne piégeant que les radicaux libres produits en réponse au $TNF\alpha$ et $IFN\gamma$ dans le modèle ConA, l'extrait aqueux n'agirait que sur une branche du mécanisme sans agir sur la source. En revanche, dans le modèle CCl_4 , en piégeant les radicaux libres issus de la bioactivation du CCl_4 , l'extrait agirait sur la source des dommages et anticiperait sur la production des médiateurs pro-inflammatoires et donc sur la mise en place des lésions. Cette hypothèse de mécanisme d'action de l'extrait aqueux, est en adéquation avec les observations de Nakashima et al. qui en 2008, ont reporté que l'atténuation de l'hépatite à la ConA par un piègeur de radicaux libres n'était pas nécessairement accompagnée d'une réduction des cytokines [279]. De plus, elle est renforcée d'une part, par la présence du composé anti-radicalaire mis en évidence et isolé lors du fractionnement de cet extrait aqueux et d'autre part par l'efficacité de cet extrait sur le stress oxydant induit par le $TNF\alpha$ et $IFN\gamma$ dans le modèle ConA.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Malgré les progrès observés en recherche ces dernières années, les hépatites restent un problème de santé publique majeur dans le monde. Dans les pays en voie de développement où l'accès aux traitements manufacturés n'est pas garanti, la médecine traditionnelle (dont les plantes médicinales), reste la ressource facilement accessible pour les soins de santé primaire. Malheureusement, malgré des siècles d'utilisation, les données scientifiques rigoureuses sur l'utilisation des plantes médicinales restent insuffisantes pour assurer une prise en charge sécurisée des malades qui y ont recours. L'Euphorbiacée *Neoboutonia velutina* Prain, est utilisée en médecine traditionnelle camerounaise pour le traitement des affections du foie. Mais comme plusieurs autres plantes médicinales, peu d'informations sont disponibles quant au profil pharmacologique et toxicologique de cette plante. C'est donc qu'il était question dans cette étude, d'évaluer les propriétés hépatoprotectrices de *Neoboutonia velutina* dans le but de confirmer, améliorer ou infirmer son utilisation traditionnelle et donc de documenter les données oralement recueillies sur cette plante.

Nous avons dans un premier temps, dressé un profil phytochimique et toxicologique des extraits aqueux et éthanolique de *N. velutina*. Ce qui a révélé la présence des stérols et polyterpènes dans l'extrait éthanolique préparé pour mimer l'extrait traditionnel et celle des saponines et glycosides dans l'extrait aqueux visant à simplifier l'utilisation de la plante. La présence de ces composés était associée à une activité anti-radicalaire des deux extraits. L'activité antiradicalaire de l'extrait éthanolique s'est avérée meilleure que celle de l'extrait aqueux. Cependant cet extrait éthanolique s'est révélé être le plus toxique des deux extraits, ce qui a limité nos investigations sur celui-ci. Par ailleurs, notre travail a conduit à la mise en évidence de la propriété anti-inflammatoire de nos extraits sur les cellules et chez la souris. Nous avons en plus, démontré un effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux en administration curative lors d'une hépatite aiguë chez la souris.

En second temps, nous avons évalué les effets de l'extrait aqueux en administration préventive suivant deux modèles d'hépatite. Ce qui a permis de confirmer l'effet hépatoprotecteur de cet extrait et d'ébaucher un mécanisme d'action. Ainsi, nous avons démontré, un remarquable effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux dans le modèle d'hépatite aiguë au tétrachlorure de carbone (CCl₄) mais un faible effet dans le modèle d'hépatite à la Concanavalin A (ConA). Tandis que le modèle CCl₄ renvoie à une hépatite impliquant fortement les radicaux libres, le modèle ConA mime une hépatite auto-immune impliquant fortement la réponse

immunitaire. Cette sélectivité d'efficacité de l'extrait aqueux nous a permis de conclure à une capacité hépatoprotectrice modèle-dépendant de cet extrait. Le mécanisme d'action hépatoprotecteur de l'extrait aqueux passerait donc par son activité anti-radicalaire. Cette hypothèse de mécanisme d'action a été motivée par l'isolement d'un composé à activité anti-radicalaire à la suite du fractionnement de l'extrait aqueux, composé dont l'identification est envisagée ultérieurement.

En définitive, les résultats de notre étude fournissent les premiers arguments scientifiques en faveur de l'utilisation traditionnelle de *N. velutina* contre les hépatites. Des études plus poussées sont nécessaires pour assurer au mieux l'utilisation sécurisée de cette plante et circonscrire son efficacité. L'étude de l'efficacité de la plante lors d'une hépatite chronique (fibrose hépatique) pourrait être intéressante, de même que son effet sur la régénération hépatique. Toutefois, les Euphorbiacées étant réputées toxiques, un accent sur les études de toxicité (toxicité sub-chronique et chronique) sera nécessaire. Par ailleurs, pour bénéficier du potentiel thérapeutique de l'extrait éthanolique sans être confronté à sa toxicité, il serait bénéfique d'étudier les effets de cet extrait à très faibles doses.

Compte tenu de nos résultats, nous recommandons une utilisation des écorces de *Neoboutonia velutina* en macération dans de l'eau et un respect des doses préconisées pour assurer la sécurité du malade ayant recours à la médecine traditionnelle.

REFERENCES

- [1] Benhamou JP. Hépatologie clinique. Paris: Flammarion médecine-sciences, 2002.
- [2] OMS. Hépatite virale Rapport du Secrétariat soixante-troisième assemblée mondiale de la santé A63/15 Point 11.12 de l'ordre du jour provisoire. 2010.
- [3] WHO | Hepatitis C, WHO, 2013. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. [Consulté le: 26-mai-2014].
- [4] WHO | Hepatitis B, WHO, 2013. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. [Consulté le: 26-mai-2014].
- [5] Mohamoud YA, Mumtaz GR, Riome S, Miller D, Abu-Raddad L J. The epidemiology of hepatitis C virus in Egypt: a systematic review and data synthesis. *BMC Infect Dis* 2013; 13:288.
- [6] Spengler EKJ, Dunkelberg J, Schey R. Alcoholic Hepatitis: current management. *Dig Dis Sci* 2014; 59:2357-66.
- [7] Shah VH. Alcoholic liver disease: The buzz may be gone, but the hangover remains. *Hepatology* 2010; 51(5):1483-1484.
- [8] Albano E. Oxidative mechanisms in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Mol Aspects Med* 2008; 29 (1-2):9-16.
- [9] Mathurin P, Louvet A, Duhamel A, et al. Prednisolone with vs without pentoxifylline and survival of patients with severe alcoholic hepatitis: A randomized clinical trial. *JAMA* 2013; 310(10):1033-1041.
- [10] Pawlotsky JM. Hepatitis C Virus: Standard-of-Care Treatment. In: *Advances in Pharmacology*, 67, Erik De Clercq, Éd. Academic Press. 2013.
- [11] Gao B et Bataller R. Alcoholic Liver Disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 2011; 141(5):1572-1585.
- [12] Pockros P J. Advances in newly developing therapy for chronic hepatitis C virus infection. *Front Med* 2014; 8(2): 166-174.
- [13] Bourlière M, Khaloun A, Wartelle-Bladou C, Oules V, Portal I, Benali S, Adhoute X, Castellani P. Chronic hepatitis C: Treatments of the future. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35 Supplement 2: S84-S95.
- [14] Geng CA, Wang L J, Guo RH, Chen JJ. Small-molecule inhibitors for the treatment of hepatitis B virus documented in patents. *Mini Rev Med Chem*, 2013.
- [15] Tujios SR et Lee WM. Update in the management of chronic hepatitis B. *Curr Opin Gastroenterol* 2013; 29(3):250-256.
- [16] Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ* 1985; 63(6)965-981.
- [17] Farnsworth NR. The role of ethnopharmacology in drug development. *Ciba Found Symp* 1990; 154:2-11; discussion 11-21.
- [18] Cox P A. The ethnobotanical approach to drug discovery: strengths and limitations. *Ciba Found Symp* 1994; 185:25-36; discussion 36-41.
- [19] Fabricant DS et Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect* 2001; 109, Supplement 1; 69-75.
- [20] Gilani AH et Rahman A. Trends in ethnopharmacology. *J Ethnopharmacol* 2005; 100 (1-2):43-49.
- [21] WHO. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva 2000; 80.
- [22] Lev E et Amar Z. Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *J Ethnopharmacol* 2002; 82(2-3):131-145.
- [23] Reyes-Garcia V. The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. *J Ethnobiol Ethnomed* 2010; 6:32.
- [24] Witt CM. Clinical research on traditional drugs and food items--the potential of comparative effectiveness research for interdisciplinary research. *J Ethnopharmacol* 2013; 147(1):254-258.
- [25] Arciello M, Gori M, Balsano C. Mitochondrial Dysfunctions and Altered Metals Homeostasis: New Weapons to Counteract HCV-Related Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 971024.
- [26] Jang JY et Chung RT. Chronic Hepatitis C. *Gut Liver* 2011; 5(2):117-132.

-
- [27] Bruneton J. *Plantes toxiques Végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux*. 3ème édition. EMinter et éditions TEC et DOC, 2005.
- [28] Botineau M. *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Editions TEC&DOC, Lavoisier, 2010.
- [29] Namsa ND, Tag H, Mandal M, Kalita P, Das A K. An ethnobotanical study of traditional anti-inflammatory plants used by the Lohit community of Arunachal Pradesh, India. *J Ethnopharmacol* 2009; 125(2):234-245.
- [30] Polat R et Satil F. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir-Turkey). *J Ethnopharmacol* 2012; 139(2):626-641.
- [31] Hernández T, Canales M, Avila JG, Duran A, Caballero J, Romo de Vivar A, Lira R. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *J Ethnopharmacol* 2003; 88(2-3): 181-188.
- [32] Teklehaymanot T. Ethnobotanical study of knowledge and medicinal plants use by the people in Dek Island in Ethiopia. *J Ethnopharmacol* 2009; 124(1):69-78.
- [33] Muthee JK, Gakuya DW, Mbaria JM, Kareru PG, Mulei CM, Njonge FK. Ethnobotanical study of anthelmintic and other medicinal plants traditionally used in Loitokitok district of Kenya. *J Ethnopharmacol* 2011; 135(1):15-21.
- [34] Boyom FF, Kemgne EM, Tepongning R, Ngouana V, Mbacham WF, Tsamo E, Zollo PHA, Gut J, Rosenthal PJ. Antiplasmodial activity of extracts from seven medicinal plants used in malaria treatment in Cameroon. *J Ethnopharmacol* 2009; 123(3):483-488.
- [35] Panneerselvam C, Murugan K, Kovendan K, Kumar PM, Subramaniam J. Mosquito larvicidal and pupicidal activity of *Euphorbia hirta* Linn. (Family: Euphorbiaceae) and *Bacillus sphaericus* against *Anopheles stephensi* Liston. (Diptera: Culicidae). *Asian Pac J Trop Med* 2013; 6(2):102-109.
- [36] Suárez AI, Compagnone RS, Salazar-Bookaman M M, Tillett S, Delle Monache F, Di Giulio C, Bruges G. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 2003; 88(1):11-14.
- [37] Dimo T, Nguemfo EL, Nguielefack TB, Azebaze GBA, Asongalem AE, Tan VP, Kamtchouing P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethyl acetate stem bark extract of *Bridelia scleroneura* (Euphorbiaceae). *Inflammopharmacology* 2006; 14(1-2): 42-47.
- [38] Alonso-Castro A. J., Ortiz-Sánchez E., Domínguez F., López-Toledo G., Chávez M., de J. Ortiz-Tello A., García-Carrancá A. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 2012; 140 (2):438-442.
- [39] de Oliveira TL, Munhoz ACM, Lemes BM, Minozzo BR, Nepel A, Barison A, Fávero GM, Campagnoli EB, Beltrame FL. Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. *J Ethnopharmacol* 2013; 150(1):263-269.
- [40] Badgujar SB. Evaluation of hemostatic activity of latex from three Euphorbiaceae species. *J Ethnopharmacol* 2014; 151(1):733-739.
- [41] Goyal M, Nagori BP, Sasmal D. Wound healing activity of latex of *Euphorbia caducifolia*. *J Ethnopharmacol* 2012; 144(3):786-790.
- [42] Ghosh S, Samanta A, Mandal NB, Bannerjee S, Chattopadhyay D. Evaluation of the wound healing activity of methanol extract of *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit leaf and its isolated active constituents in topical formulation. *J Ethnopharmacol* 2012; 142(3):714-722.
- [43] L. Alvarez A., Dalton K. P., Nicieza I., Diñeiro Y., Picinelli A., Melón S., Roque A., Suárez B., Parra F. Bioactivity-guided fractionation of *Phyllanthus orbicularis* and identification of the principal anti HSV-2 compounds. *Phyther Res* 2012; 26(10): 1513-1520.
- [44] Perumal S, Mahmud R, Pillai S, Lee WC, Ramanathan S. Antimicrobial Activity and Cytotoxicity Evaluation of *Euphorbia hirta* (L.) Extracts from Malaysia. *APCBEE Procedia* 2012; 2:80-85.
- [45] Siwe Noundou X, Krause RWM, van Vuuren SF, Tantoh Ndinteh D, Olivier DK. Antibacterial activity of the roots, stems and leaves of *Alchornea floribunda*. *J Ethnopharmacol* 2014; 151(2):1023-1027.

-
- [46] Raven P, Evert RF, Eichhorn SE, Biologie végétale. Bruxelles: De Boeck Université, 2003.
- [47] Nesseim T, Fillet M, Mergeai G, Dieng A, Hornick JL. Principes toxiques, toxicité et technologie de détoxification de la graine de *Jatropha curcas* L. (synthèse bibliographique). *Biotechnol Agron Soc Environ* 2012; 16(4):531-540.
- [48] Buske A, Busemann S, Mühlbacher J, Schmidt J, Porzel A, Bringmann G, Adam G. Antidesmone, a novel type isoquinoline alkaloid from *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae) 1. *Tetrahedron* 1999; 55:1079-1086.
- [49] Bringmann G, Schlauer J, Rischer H, Wohlfarth M, Mühlbacher J, Buske A, Porzel A, Schmidt J, Adam G. Revised Structure of Antidesmone, an Unusual Alkaloid from Tropical *Antidesma* Plants (Euphorbiaceae) *Tetrahedron* 2000; 56: 3691-3695.
- [50] Wu Y, Qu W, Geng D, Liang JY, Luo YL. Phenols and flavonoids from the aerial part of *Euphorbia hirta*. *Chin J Nat Med* 2012; 10(1):40-42.
- [51] Wandji J, Wansi JD, Fuendjiep V, Dagne E, Mulholland DA, Tillequin F, Fomum ZT, Sondengam BL, Nkeh BC, Njamen D. Sesquiterpene lactone and friedelane derivative from *drypetes molunduana*. *Phytochemistry* 2000; 54(8):811-815.
- [52] Catalán C AN, de Heluani CS, Kotowicz C, Gedris TE, Herz W. A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. *Phytochemistry* 2003; 64(2):625-629.
- [53] Goel G, Makkar HPS, Francis G, Becker K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int J Toxicol* 2007; 26(4):279-288.
- [54] Gustafson K. R., Cardellina 2nd J. H., McMahon J. B., Gulakowski R. J., Ishitoya J., Szallasi Z., Lewin N. E., Blumberg P. M., Weislow O. S., Beutler J. A. A nonpromoting phorbol from the samoan medicinal plant *Homalanthus nutans* inhibits cell killing by HIV-1. *J Med Chem* 1992; 35(11):1978-1986.
- [55] Johnson HE, Banack SA, Cox PA. Variability in content of the anti-AIDS drug candidate prostratin in Samoan populations of *Homalanthus nutans*. *J Nat Prod* 2008; 71(12):2041-2044.
- [56] Williams S A, Chen LF, Kwon H, Fenard D, Bisgrove D, Verdin E, Greene WC. Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB. *J Biol Chem* 2004; 279(40):42008-42017.
- [57] Roengsumran S, Petsom A, Sommit D, Vilaivan T. Labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Phytochemistry* 1999; 50(3):449-453.
- [58] Ngadjui BT, Folefoc GG, Keumedjio F, Dongo E, Sondengam BL, Connolly JD. Crotonadiol, a labdane diterpenoid from the stem bark of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry* 1999; 51(1):171-174.
- [59] Hohmann J et Molnár J. Euphorbiaceae diterpenes: plant toxins or promising molecules for the therapy? *Acta Pharm Hung* 2004; 74(3)149-157.
- [60] Engi H, Vasas A, Rédei D, Molnár J, Hohmann J. New MDR modulators and apoptosis inducers from *Euphorbia* species. *Anticancer Res* 2007; 27(5A):3451-3458.
- [61] Vasas A, Sulyok E, Rédei D, Forgo P, Szabó P, Zupkó I, Berényi Á, Molnár J, Hohmann J. Jatrophanes diterpenes from *Euphorbia esula* as antiproliferative agents and potent chemosensitizers to overcome multidrug resistance. *J Nat Prod* 2011; 74(6)1453-1461.
- [62] Lemmens R, Louppe D, Oteng-Amoako AA. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 7(2). Bois d'oeuvre 2. [Traduction de: Plant Resources of Tropical Africa 7(2).Timbers 2. 2012]. Fondation Prota. Wageningen Pays-Bas/CTA, Wageningen, Pays-bas, 2012.
- [63] Polhill R. Flora of Tropical East Africa: Euphorbiaceae, Part 1, 1988.
- [64] Long C, Beck J, Cantagrel F, Marcourt L, Vendier L, David B, Plisson F, Derguini F, Vandenberghe I, Aussagues Y, Ausseil F, Lavaud C, Sautel F, Massiot G. Proteasome inhibitors from *Neoboutonia melleri*. *J Nat Prod* 2012; 75(1)34-47.
- [65] Hutchison J et Dalziel JM. Flora of West Tropical Africa. In: Keay, R.W.J. (Ed.), 2nd edition, vol 1, part 2 London: Crown Agents for Overseas Governments and Administrations, 1958.
- [66] Tchinda AT, Tsopmo A, Tene M, Kamnaing P, Ngnokam D, Tane P, Ayafor JF, Connolly JD, Farrugia LJ. Diterpenoids from *Neoboutonia glabrescens* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 2003; 64(2): 575-581.

-
- [67] Thomas D, Thomas JM, Bromley WA. Korup Ethno-botany Survey. WWF, Surrey, UK, 1989.
- [68] Kirira PG, Rukunga GM, Wanyonyi AW, Muregi FM, Gathirwa JW, Muthaura CN, Omar SA, Tolo F, Mungai GM, Ndiege IO. Anti-plasmodial activity and toxicity of extracts of plants used in traditional malaria therapy in Meru and Kilifi Districts of Kenya. *J Ethnopharmacol* 2006; 106(3):403-407.
- [69] Kirira PG, Rukunga GM, Wanyonyi AW, Muthaura C N, Mungai GM, Machocho AK, Ndiege I O. Tiglane diterpenoids from the stem bark of *Neoboutonia macrocalyx*. *J Nat Prod* 2007; 70(5):842-845.
- [70] Harbone J et Herbert B. *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Taylor and Francis Ltd. London, 1993.
- [71] Tene M, Tane P, Tamokou JDD, Kuate JR, Connolly JD. Degraded diterpenoids from the stem bark of *Neoboutonia mannii*. *Phytochem Lett* 2008; 1:120-124.
- [72] Burkill H. *The useful plants of west tropical Africa*, vol 2. 1985.
- [73] Titanji VPK, Zofou D, Ngemenya MN. The antimalarial potential of medicinal plants used for the treatment of malaria in Cameroonian folk medicine. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2008; 5(3):302-321.
- [74] Zhao W, Wolfender JL, Mavi S, Hostettmann K. Diterpenes and sterols from *Neoboutonia melleri*. *Phytochemistry* 1998; 48(7):1173-1177.
- [75] Beck J, Guminski Y, Long C, Marcourt L, Derguini F, Plisson F, Grondin A, Vandenberghe I, Vispé S, Brel V, Aussagues Y, Ausseil F, Arimondo PB, Massiot G, Sautel F, Cantagrel F. Semisynthetic neoboutomellerone derivatives as ubiquitin-proteasome pathway inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2012; 20(2):819-831.
- [76] Dadoune J, Hadjisky P, Siffroi JP, Vendrely E. *De la biologie à la clinique, histologie*, Ed. Médecine Sciences. Paris: Flammarion, 1990.
- [77] Bourel M. *Hépatologie, Ellipses/Aupelf*. Paris, 1991.
- [78] Marieb EN et Hoehn Katja. *Anatomie et Physiologie Humaines*, Edition du Renouveau Pédagogique Inc. 2010.
- [79] Kmieć Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001; 161: III-XIII, 1-151.
- [80] Shaffer EA, Thomson. Canadian Association of Gastroenterology, Canadian Association for the Study of the Liver, Ortho Pharmaceutical Ltd, et Janssen Pharmaceuticals Division, *First principles of gastroenterology: the basis of disease and an approach to management*. 2005.
- [81] Zorn AM. Liver development. In *StemBook*, Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute, 2008.
- [82] Lauth WW. *Hepatic Circulation: Physiology and Pathophysiology*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2009.
- [83] Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell* 2010; 18(2):175-189.
- [84] Miyajima A, Tanaka M, Itoh T. Stem/Progenitor Cells in Liver Development, Homeostasis, Regeneration, and Reprogramming. *Cell Stem Cell* 2014; 14(5):561-574.
- [85] Alison MR, Golding MHC, Sarraf CE. Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. *Cell Prolif* 1996; 29(7):373-402.
- [86] Gaudio E, Carpino G, Cardinale V, Franchitto A, Onori P, Alvaro D. New insights into liver stem cells. *Dig Liver Dis* 2009; 41(7): 455-462.
- [87] Greenbaum LE et Wells RG. The role of stem cells in liver repair and fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43(2):222-229.
- [88] Libbrecht L et Roskams T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13(6):389-396.
- [89] Guyton AC, Hall JE. *Textbooks of Medical Physiology*, 9th ed., USA: Saunders, 1996.
- [90] Shih MC, Tseng SH, Weng YS, Chu IM, Liu CH. A microfluidic device mimicking acinar concentration gradients across the liver acinus. *Biomed Microdevices* 2013; 15(5):767-780.
- [91] Di Fiore MSH. *Atlas of human histology*, 2nd ed., (Lea and Febiger). Philadelphia, 1965.

-
- [92] Levine P, McDaniel K, Francis H, Kennedy L, Alpini G, Meng F. Molecular mechanisms of stem cell therapy in alcoholic liver disease. *Dig Liver Dis* 2014; 46(5):391-397.
- [93] Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL. Liver regeneration. *Transl Res* 2014; 163(4):352-362.
- [94] Burkitt HG, Young B, Heath JW, Deakin PJ. *Wheater's Functional Histology: A text and colour Atlas*, 3rd ed., Longman, Churchill, Livingstone, 1993.
- [95] Streba LAM, Vere CC, Ionescu AG, Streba C, Rogoveanu I. Role of intrahepatic innervation in regulating the activity of liver cells. *World J Hepatol* 2014; 6(3):137-143.
- [96] Xu R, Huang H, Zhang Z, Wang FS. The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cell Mol Immunol* 2014; 11(3):224-231.
- [97] Uhl P, Fricker G, Haberkorn U, Mier W. Current Status in the Therapy of Liver Diseases. *Int J Mol Sci* 2014; 15(5):7500-7512.
- [98] Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006; 45(4):529-538.
- [99] Fassio E. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol* 2010; 9 Suppl, p. 119-122.
- [100] El-Serag HB. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma, *Gastroenterology* 2012; 142(6):1264-1273.
- [101] Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5(9):558-567.
- [102] Marcellin P, Pequignot F, Delarocque-Astagneau E, Zarski JP, Ganne N, Hillon P, Antona D, Bovet M, Mechain M, Asselah T, Desenclos JC, Jougla E. Mortality related to chronic hepatitis B and chronic hepatitis C in France: Evidence for the role of HIV coinfection and alcohol consumption. *J Hepatol* 2008; 48(2):200-207.
- [103] Marcellin P et Asselah T. Viral hepatitis: Impressive advances but still a long way to eradication of the disease. *Liver Int* 2014; 34:1-3.
- [104] Saleh DAA, Amr S, Jillson IA, Wang JHY, Khairy WA, Loffredo CA. Knowledge and perceptions of hepatitis c infection and pesticides use in two rural villages in Egypt. *BMC Public Health* 2014; 14(1):501.
- [105] Mousa SM. Hepatitis C among Egyptian patients referred for bone marrow examination: Seroprevalence and analysis of hematological findings. *Bone Marrow Res* 2014; 2014:549716.
- [106] Sougioultzis S, Dalakas E, Hayes PC, Plevris JN. Alcoholic hepatitis: from pathogenesis to treatment. *Curr Med Res Opin* 2005; 21(9):1337-1346.
- [107] Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic Hepatitis. *New Engl J Med* 2009; 360(26):2758-2769.
- [108] Mathurin P et Lucey MR. Management of alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2012; 56 Supplement 1; S39-S45.
- [109] Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen Jr MP, Thapa GB, Thapa N, Myint KSA, Fourneau M, Kushner RA, Shrestha SK, David MP, Seriwatana J, Vaughn DW, Safary A, Endy TP, Innis B L. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* 2007; 356(9):895-903.
- [110] Proffitt A. First HEV vaccine approved. *Nat Biotech* 2012; 30(4):300-300.
- [111] Santantonio TA et Fasano M. Chronic hepatitis B: Advances in treatment. *World J Hepatol* 2014; 6(5):284-292.
- [112] Skupsky J et Hu KQ. Current hepatitis B treatment guidelines and future research directions. *Front Med* 2014; 8(2):145-157.
- [113] Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: standard-of-care treatment. *Adv Pharmacol* 2013; 67:169-215.
- [114] Sarrazin C, Hézode C, Zeuzem S, Pawlotsky JM. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2012; 56 Suppl 1, S88-100.
- [115] Flisiak R, Feinman SV, Jablkowski M, Horban A, Kryczka W, Pawlowska M, Heathcote JE, Mazzella G, Vandelli C, Nicolas-Métral V, Groscurin P, Liz JS, Scalfaro P, Porchet H, Crabbé R. The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFN α 2a significantly reduces viral load in treatment-naïve hepatitis C patients. *Hepatology* 2009; 49(5):1460-1468.

-
- [116] Casanova J et Bataller R. Alcoholic hepatitis: Prognosis and treatment. *Gastroenterol Hepatol* 2014; 37(4):262-268.
- [117] Diesen DL et Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. *J Surg Res.* 2010; 162(1):95-109.
- [118] Paur I, Carlsen MH, Halvorsen BL, Blomhoff R. Antioxidants in herbs and spices: Roles in oxidative stress and redox signaling. In *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, 2nd éd., I. F. F. Benzie et S. Wachtel-Galor, Éd. Boca Raton (FL): CRC Press, 2011.
- [119] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1):44-84.
- [120] Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N, Feelisch M, Fukuto J, Wink DA. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* 2004; 385(1):1-10.
- [121] Hancock JT. The role of redox mechanisms in cell signalling. *Mol Biotechnol* 2009; 43(2):162-166.
- [122] Klatt P et Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 2000; 267 (16): 4928-4944.
- [123] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160 (1):1-40.
- [124] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(3):337-349.
- [125] Rashed MN. The role of trace elements on hepatitis virus infections: A review. *J Trace Elem Med Biol* 2011; 25(3):181-187.
- [126] Eidi A, Mortazavi P, Behzadi K, Rohani AH, Safi S. Hepatoprotective effect of manganese chloride against CCl₄-induced liver injury in rats. *Biol Trace Elem Res* 2013; 155(2):267-275.
- [127] Mueller S. Increased iron in HCV infection: collateral damage or antiviral defense? *J Hepatol* 2010; 53(6):990-992.
- [128] Fillebeen C et Pantopoulos K. Iron inhibits replication of infectious hepatitis C virus in permissive Huh7.5.1 cells. *J Hepatol* 2010; 53(6):995-999.
- [129] Fillebeen C et Pantopoulos K. Hepatitis C virus infection causes iron deficiency in huh7.5.1 cells. *PLoS One* 2013; 8(12):e83307.
- [130] Loguercio C et Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(1):1-10.
- [131] Diesen DL et Kuo PC. Nitric Oxide and Redox Regulation in the Liver: Part II. Redox Biology in Pathologic Hepatocytes and Implications for Intervention. *J Surg Res.* 2011; 167(1):96-112.
- [132] Panchenko LF, Davydov BV, Terebilina NN, Baronets VI, Zhuravleva A S. Oxidative stress in the of alcoholic liver disease. *Biomed Khim* 2013; 59(4):452-458.
- [133] Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci* 2013; 14(10):20704-20728.
- [134] Guo CH, Chen PC, Ko WS. Status of essential trace minerals and oxidative stress in viral hepatitis C patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Med Sci* 2013; 10 (6):730-737.
- [135] Houldsworth A, Metzner M, Shaw S, Kaminski E, Demaine AG, Cramp ME. Polymorphic differences in SOD-2 may influence HCV viral clearance. *J Med Virol* 2014; 86(6):941-947.
- [136] Pawlotsky JM. Treatment of chronic hepatitis C: current and future. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 369:321-342.

-
- [137] Arciello M, Gori M, Balsano C. Mitochondrial Dysfunctions and Altered Metals Homeostasis: New Weapons to Counteract HCV-Related Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013:971024.
- [138] Yang F, Robotham JM, Nelson HB, Irsigler A, Kenworthy R, Tang H. Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J Virol* 2008; 82(11):5269-5278.
- [139] Gallay PA. Cyclophilin Inhibitors. *Clin Liver Dis* 2009; 13(3):403-417.
- [140] Liu Z, Yang F, Robotham JM, Tang H. Critical role of cyclophilin A and its prolyl-peptidyl isomerase activity in the structure and function of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol* 2009; 83(13):6554-6565.
- [141] Fischer G, Gallay P, Hopkins S. Cyclophilin inhibitors for the treatment of HCV infection. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11(8):911-918.
- [142] Waller H, Chatterji U, Gallay P, Parkinson T, Targett-Adams P. The use of AlphaLISA technology to detect interaction between hepatitis C virus-encoded NS5A and cyclophilin A. *J Virol Methods* 2010; 165(2):202-210.
- [143] Foster TL, Gallay P, Stonehouse NJ, Harris M. Cyclophilin A interacts with domain II of hepatitis C virus NS5A and stimulates RNA binding in an isomerase-dependent manner. *J Virol* 2011; 85(14):7460-7464.
- [144] Gallay PA. Cyclophilin inhibitors: a novel class of promising host-targeting anti-HCV agents. *Immunol Res* 2012; 52(3):200-210.
- [145] Lin K, Gallay P. Curing a viral infection by targeting the host: the example of cyclophilin inhibitors. *Antiviral Res* 2013; 99(1):68-77.
- [146] Paeshuyse J, Kaul A, De Clercq E, Rosenwirth B, Dumont JM, Scalfaro P, Bartenschlager R, Neyts J. The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* 2006; 43(4):761-770.
- [147] Coelmont L, Hanouille X, Chatterji U, Berger C, Snoeck J, Bobardt M, Lim P, Vliegen I, Paeshuyse J, Vuagniaux G, Vandamme AM, Bartenschlager R, Gallay P, Lippens G, Neyts J. DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS One* 2010; 5(10): e13687.
- [148] Patel H et Heathcote EJ. Sustained virological response with 29 days of Debio 025 monotherapy in hepatitis C virus genotype 3. *Gut* 2011; 60(6):879-879.
- [149] Gallay PA, Ptak RG, Bobardt MD, Dumont JM, Vuagniaux G, Rosenwirth B. Correlation of naturally occurring HIV-1 resistance to DEB025 with capsid amino acid polymorphisms. *Viruses* 2013; 5(3):981-997.
- [150] Gallay PA et Lin K. Profile of alisporivir and its potential in the treatment of hepatitis C. *Drug Des Devel Ther* 2013; 7:105-115.
- [151] Chatterji U, Garcia-Rivera J A, Baugh J, Gawlik K, Wong KA, Zhong W, Brass C A, Naoumov NV, Gallay PA. The Combination of Alisporivir plus an NS5A Inhibitor Provides Additive to Synergistic Anti-Hepatitis C Virus Activity without Detectable Cross-Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(6):3327-3334.
- [152] Quarato G, D'Aprile A, Gavillet B, Vuagniaux G, Moradpour D, Capitanio N, Piccoli C. The cyclophilin inhibitor alisporivir prevents hepatitis C virus-mediated mitochondrial dysfunction. *Hepatology* 2012; 55(5):1333-1343.
- [153] Wagoner J, Negash A, Kane OJ, Martinez LE, Nahmias Y, Bourne N, Owen DM, Grove J, Brimacombe C, McKeating JA, Pécheur EI, Graf TN, Oberlies NH, Lohmann V, Cao F, Tavis JE, Polyak SJ. Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology* 2010; 51(6):1912-1921.
- [154] Calland N, Dubuisson J, Rouille Y, Seron K. Hepatitis C Virus and Natural Compounds: A New Antiviral Approach? *Viruses* 2012; 4(10):2197-2217.
- [155] Calland N, Albecka A, Belouzard S, Wychowski C, Duverlie G, Descamps V, Hober D, Dubuisson J, Rouillé Y, Séron K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology* 2012; 55(3):720-729.
- [156] Mezey E, Potter JJ, Rennie-Tankersley L, Caballeria J, Pares A. A randomized placebo controlled trial of vitamin E for alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2004; 40(1):40-46.

-
- [157] Parés A, Planas R, Torres M, Caballería J, Viver JM, Acero D, Panés J, Rigau J, Santos J, Rodés J. Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled, double-blind, randomized and multicenter trial. *J Hepatol* 1998; 28(4):615-621.
- [158] Nguyen-Khac E, Thevenot T, Piquet MA, Benferhat S, Hezam A, Gorla O, Tramier B, Chatelain D, Dupas JL. Antioxydants plus corticostéroïdes dans le traitement de l'hépatite alcoolique aiguë: la question est toujours ouverte. *J Hepatol* 2008; 49(1):147-148.
- [159] Nguyen-Khac E, Thevenot T, Piquet MA, Benferhat S, Gorla O, Chatelain D, Tramier B, Dewaele F, Ghrib S, Rudler M, Carbonell N, Tossou H, Bental A, Bernard-Chabert B, Dupas JL, AAH-NAC Study Group. Glucocorticoides plus N-acétylcystéine dans l'hépatite alcoolique aiguë. *N Engl J Med* 2011; 365(19):1781-1789.
- [160] Gao F, Fu Z, Tian H, He Z. L'extraire de *Euphorbia lunulata* Bge inhibe la prolifération des cellules hépatomateuses humaines HepG2 et induit l'apoptose. *J BUON* 2013; 18(2):491-495.
- [161] Wieland SF. Le modèle chimpanzé pour l'infection à l'hépatite B. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5(6).
- [162] Billerbeck E, de Jong Y, Dorner M, de la Fuente C, Ploss A. Modèles animaux pour l'hépatite C. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 369:49-86.
- [163] Dorner M, Rice CM, Ploss A. Étude de l'entrée de l'hépatite C dans des souris génétiquement humanisées. *Methods* 2013; 59(2):249-257.
- [164] Yan H, et Li W. Le sodium taurocholate cotransporte un polypeptide qui agit comme un récepteur pour l'hépatite B et D. *Dig Dis* 2015; 33(3):388-396.
- [165] Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes C N, Chayama K, Tateno C. Nouveau modèle robuste de l'hépatite B in vitro utilisant des cellules hépatocytaires humaines isolées de souris humanisées. *Am J Pathol* 2015; 185(5):1275-1285.
- [166] Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. Modèles in vitro pour l'analyse du cycle de vie de l'hépatite C. *Microbiol. Immunol.* 2012; 56(1):1-9.
- [167] Weber LWD, Boll M, Stampfl A. Hépatotoxicité et mécanisme d'action des haloalcanes: le tétrachlorure de carbone comme modèle toxicologique. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33(2):105-136.
- [168] Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. Lésion hépatique expérimentale dépendante des cellules T induite par le concanavalin A. *J Clin Invest.* 1992; 90(1):196-203.
- [169] Schümann J, Prockl J, Kiemer AK, Vollmar AM, Bang R, Tiegs G. Le silibinine protège les souris de la lésion hépatique dépendante des cellules T. *J Hepatol* 2003; 39(3):333-340.
- [170] McGill MR, Williams CD, Xie Y, Ramachandran A, Jaeschke H. Lésion hépatique induite par l'acétaminophène chez les rats et les souris: comparaison des adduits protéiques, de la dysfonction mitochondriale, et du stress oxydatif dans le mécanisme de toxicité. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 264(3):387-394.
- [171] Deutsch M, Graffeo CS, Rokosh R, Pansari M, Ochi A, Levie EM, Van Heerden E, Tippens DM, Greco S, Barilla R, Tomkötter L, Zambirinis CP, Avanzi N, Gulati R, Pachter HL, Torres-Hernandez A, Eisenthal A, Daley D, Miller G. Effets divergents de la blocage de RIP1 ou de RIP3 dans des modèles murins de lésion hépatique aiguë. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1759.
- [172] Hamesch K, Borkham-Kamphorst E, Strnad P, Weiskirchen R. Lésion hépatique inflammatoire induite par les lipopolysaccharides chez les souris. *Lab Anim* 2015; 49(1):37-46.
- [173] Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Synthèse contrôlée de l'HBsAg dans une lignée cellulaire dérivée d'un carcinome hépatocyttaire humain différencié. *Nature* 1979; 282(5739): 615-616.
- [174] Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Canie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. Infection d'une lignée cellulaire hépatomateuse humaine par l'hépatite B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(24):15655-15660.
- [175] Trease GW et Evans. *Pharmacognosy*. Ballière Tindall Press, London, 309-706; 1983.
- [176] Deleu-Quettier Christel. Les polyphénols bioactifs de l'aubépine (*Crataegus monogyna*) et du sarrasin (*Fagopyrum esculentum*): obtention in vivo et in vitro. Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Technologies de Lille; 2000.
- [177] Randerath K. *Chromatographie sur couches minces*. Gauthier-Villars. Paris; 1971.

-
- [178] Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Drogenanalyse-dünnschicht-chromatographische analyse von arzneidrogen. Springer-Verlag. Berlin; 1983.
- [179] Hennebelle T, Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d'antioxydants: Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota pseudodictamnus (Lamiacées) et Lippia alba (Verbenacées). Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Technologies de Lille; 2006.
- [180] Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal.Biochem.* 1999; 269 (2):337-341.
- [181] Khan MA, Rahman AA, Islam S, Khandokhar P, Parvin S, Islam MB, Hossain M, Rashid M, Sadik G, Nasrin S, Mollah MNH, Alam A. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMC Res Notes* 2013; 6:24.
- [182] Otang WM, Grierson DS, Ndip RN. Phytochemical studies and antioxidant activity of two South African medicinal plants traditionally used for the management of opportunistic fungal infections in HIV/AIDS patients. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12:43.
- [183] Benzie IF et Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1):70-76.
- [184] Aquino R, Morelli S, Lauro MR, Abdo S, Saija A, Tomaino A. Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of an Extract of *Anthurium versicolor* Leaves. *J Nat Prod* 2001; 64(8):1019-1023.
- [185] Benton JW et Vernon. Case, sampling, handling and analyzing plant tissue samples. In: Westerman RL, Third ed. SSSA Book série n°3, 1990.
- [186] Decker T et Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988; 115(1):61-69.
- [187] Clarke R, Connolly L, Frizzell C, et Elliott CT. Cytotoxic assessment of the regulated, co-existing mycotoxins aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin, in single, binary and tertiary mixtures. *Toxicon* 2014; 90:70-81.
- [188] Suo L, Kang K, Wang X, Cao Y, Zhao H, Sun X, Tong L, Zhang F. Carvacrol Alleviates Ischemia Reperfusion Injury by Regulating the PI3K-Akt Pathway in Rats. *PLoS One* 2014; 9(8):e104043.
- [189] Loo DT. In Situ Detection of Apoptosis by the TUNEL Assay: An Overview of Techniques. In *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo*, VV Didenko, Éd. Humana Press, 3-13 2011.
- [190] Delongea JL, Burnel D, Netter P, Grignon M, Mur JM, Royer RJ, Grignon G. Toxicity and pharmacokinetics of zirconium oxychloride in mice and rats. *J Pharmacol* 1983; 14(4):437-447.
- [191] OECD. Test Guideline 414. OECD Guideline for testing of chemicals. Prenatal developmental toxicity study. 2001.
- [192] Sinha AK. Colorimetric assay of catalase. *Anal. Biochem.* 1972; 47(2):389-394.
- [193] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82(1):70-77.
- [194] Misra HP et Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247 (10):3170-3175.
- [195] Wilbur K, Bernheim F, Shapiro OW. Determination of lipid peroxidation. *Arch Biochem* 1949; 24:305-310.
- [196] Slack P. Analytical methods manual, 2ème Edition. Leatherland: British food Manufacturing Industries Research Association, 1987.
- [197] Yang J, Ou B, Wise ML, Chu Y. In vitro total antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of three common oat-derived avenanthramides. *Food Chem* 2014; 160:338-345.
- [198] Nessa F et Khan SA. Evaluation of antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of different solvent extracts of leaves of *Citrullus colocynthis*. *Pharmacognosy Res.* 2014; 6(3):218-226.

-
- [199] Boumerfeg S, Baghiani A, Messaoudi D, Khennouf S, Arrar L. Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytother Res* 2009; 23(2):283-288.
- [200] Dhalwal K, Deshpande YS, Purohit AP. Evaluation of in vitro antioxidant activity of *Sida rhombifolia* (L.) ssp. *retusa* (L.). *J Med Food* 2007; 10(4):683-688.
- [201] Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira J A, Baptista P. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(7):1507-1511.
- [202] Gülçin I, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytother Res* 2007; 21(4):354-361.
- [203] Taira J, Tsuchida E, Katoh MC, Uehara M, Ogi T. Antioxidant capacity of betacyanins as radical scavengers for peroxy radical and nitric oxide. *Food Chem* 2015; 166:531-536.
- [204] Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathé G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.* 2002; 56 (4):200-207.
- [205] Scalbert A et Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000; 130(8) S Suppl: 2073S-85S.
- [206] Revuelta-Iniesta R et Al-Dujaili EAS. Consumption of Green Coffee Reduces Blood Pressure and Body Composition by Influencing 11 β -HSD1 Enzyme Activity in Healthy Individuals: A Pilot Crossover Study Using Green and Black Coffee. *Biomed Res Int* 2014; 2014:482704.
- [207] Lafka T-I, Lazou AE, Sinanoglou VJ, Lazos ES. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chem* 2011; 125(1):92-98.
- [208] Köksal E, Gülçin I, Beyza S, Sarikaya O, Bursal E. In vitro antioxidant activity of silymarin. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2009; 24(2):395-405.
- [209] Khan RA, Khan MR, Ahmed M, Sahreen S, Shah NA, Shah MS, Bokhari J, Rashid U, Ahmad B, Jan S. Hepatoprotection with a chloroform extract of *Launaea procumbens* against CCl₄-induced injuries in rats. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12(1)114.
- [210] Lee J, Lim S, Kang S-M, Min S, Son K, Lee HS, Park EM, Ngo HTT, Tran HTL, Lim Y-S, Hwang SB. Saponin inhibits hepatitis C virus propagation by up-regulating suppressor of cytokine signaling 2. *PLoS One* 2012; 7(6):e39366.
- [211] Chen Y, Miao Y, Huang L, Li J, Sun H, Zhao Y, Yang J, Zhou W. Antioxidant activities of saponins extracted from *Radix Trichosanthis*: an in vivo and in vitro evaluation. *BMC Complement Altern Med.* 2014; 14:86.
- [212] Li Y-G, Ji D-F, Zhong S, Shi L-G, Hu G-Y, Chen S. Saponins from *Panax japonicus* protect against alcohol-induced hepatic injury in mice by up-regulating the expression of GPX3, SOD1 and SOD3. *Alcohol* 2010; 45(4):320-331.
- [213] Carange J, Longpré F, Daoust B, Martinoli M-G. 24-Epibrassinolide, a Phytosterol from the Brassinosteroid Family, protects dopaminergic cells against MPP-induced oxidative stress and apoptosis. *J Toxicol*, 2011; 2011:392859.
- [214] Micallef MA et Garg ML. Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. *Atherosclerosis* 2009; 204(2):476-482.
- [215] Pak E, Esrason KT, Wu VH. Hepatotoxicity of herbal remedies: an emerging dilemma. *Prog Transplant* 2004; 14(2):91-96.
- [216] Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. Isolation and Characterization of a Stem Cell Population from Adult Human Liver. *Stem Cells* 2006; 24(12):2840-2850.
- [217] Seeff LB. Herbal hepatotoxicity. *Clin Liver Dis.* 2007; 11(3):577-596.
- [218] Alexander RE. Unregulated herbal products: potential interactions and side effects in dental patients. *Tex Dent J* 2007; 124(4):364-385.
- [219] Skalli S, Zaid A, Soulaymani R. Drug interactions with herbal medicines. *Ther Drug Monit* 2007; 29(6):679-686.
- [220] Bäcker C, Jenett-Siems K, Siems K, Wurster M, Bodtke A, Lindequist U. Cytotoxic saponins from the seeds of *Pittosporum angustifolium*. *Z Naturforsch C J Biosci* 2014; 69(5-6):191-198.

-
- [221] Feng X-Z, Dong M, Gao Z-J, Xu S-X. Three new triterpenoid saponins from *Ixeris sonchifolia* and their cytotoxic activity. *Planta Med* 2003; 69(11):1036-1040.
- [222] Fu G-M, Wang Y-H, Gao S, Tang M-J, Yu S-S. Five new cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Symplocos chinensis*. *Planta Med* 2005; 71(7):666-672.
- [223] Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(1):75-83.
- [224] Jossé R, Aninat C, Glaise D, Dumont J, Fessard V, Morel F, Poul J-M, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab Dispos* 36(6):1111-1118.
- [225] Lambert CB, Spire C, Renaud M-P, Claude N, Guillouzo A. Reproducible chemical-induced changes in gene expression profiles in human hepatoma HepaRG cells under various experimental conditions. *Toxicol in Vitro* 2009; 23(3):466-475.
- [226] Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 2007; 168(1):66-73.
- [227] Turpeinen M, Tolonen A, Chesne C, Guillouzo A, Uusitalo J, Pelkonen O. Functional expression, inhibition and induction of CYP enzymes in HepaRG cells. *Toxicol in Vitro* 2009; 23(4):748-753.
- [228] Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol* 2013; 87(14):8169-8178.
- [229] Gutierrez-Reyes G, Lopez-Ortal P, Sixtos S, Cruz S, Ramirez-Iglesias MT, Gutierrez-Ruiz MC, Sanchez-Avila F, Roldan E, Vargas-Vorackova F, Kershenobich D. Effect of pentoxifylline on levels of pro-inflammatory cytokines during chronic hepatitis C. *Scand J Immunol* 2006; 63(6):461-467.
- [230] Park SY, Han J, Kim JB, Yang M-G, Kim YJ, Lim H-J, An SY, Kim J-H. Interleukin-8 is related to poor chemotherapeutic response and tumorigenicity in hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 2014; 50(2):341-350.
- [231] Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Asano T, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S. Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes. *Infect Immun* 2002; 70(11):6294-6301.
- [232] Ohkubo K, Masumoto T, Horiike N, Onji M. Induction of CINC (interleukin-8) production in rat liver by non-parenchymal cells. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13(7):696-702.
- [233] Colletti LM, Green M, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM. Proliferative effects of CXC chemokines in rat hepatocytes in vitro and in vivo. *Shock* 1998; 10(4):248-257.
- [234] Kaibori M, Yanagida H, Nakanishi H, Ozaki T, Yoshida H, Matsui K, Hijikawa T, Kamiyama Y, Okumura T. Hepatocyte Growth Factor Stimulates the Induction of Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant Through the Activation of NF-kB in Rat Hepatocytes. *J Surg Res* 2006; 130(1):88-93.
- [235] Wei SD, Li JZ, Liu ZJ, Chen Q, Chen Y, Chen M, Gong JP. Dexamethasone attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury by downregulating glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand in Kupffer cells. *Hepatol Res* 2011; 41(10):989-999.
- [236] Zhang X-Q, Jiang L, You J-P, Liu Y-Y, Peng J, Zhang H-Y, Xu B-Y, Mao Q. Efficacy of short-term dexamethasone therapy in acute-on-chronic pre-liver failure. *Hepatol Res* 2011; 41(1):46-53.
- [237] Ghaffari H, Venkataramana M, Nayaka SC, Ghassam BJ, Angaswamy N, Shekar S, Sampath Kumara KK, Prakash HS. Hepatoprotective action of *Orthosiphon diffusus* (Benth.) methanol active fraction through antioxidant mechanisms: An in vivo and in vitro evaluation. *J Ethnopharmacol* 2013; 149(3):737-744.

-
- [238] Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* 1995; 25(1):25-65.
- [239] Akindede AJ, Ezenwanebe KO, Anunobi CC, Adeyemi OO. Hepatoprotective and in vivo antioxidant effects of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae). *J Ethnopharmacol* 2010; 129(1):46-52.
- [240] Hamdy N et El-Demerdash E. New therapeutic aspect for carvedilol: antifibrotic effects of carvedilol in chronic carbon tetrachloride-induced liver damage. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 261(3):292-299.
- [241] Huang G-J, Deng J-S, Chiu C-S, Liao J-C, Hsieh W-T, Sheu M-J, Wu C-H. Hispolon Protects against Acute Liver Damage in the Rat by Inhibiting Lipid Peroxidation, Proinflammatory Cytokine, and Oxidative Stress and Downregulating the Expressions of iNOS, COX-2, and MMP-9. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012:480714.
- [242] Huang H-L, Wang Y-J, Zhang Q-Y, Liu B, Wang F-Y, Li J-J, Zhu R-Z. Hepatoprotective effects of baicalein against CCl₄-induced acute liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 2012; 18(45):6605-6613.
- [243] Hsu Y-W, Tsai C-F, Chuang W-C, Chen W-K, Ho Y-C, Lu F-J. Protective effects of silica hydride against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(6):1644-1653.
- [244] Wang P, Zhang Y, An Y, Xu K, Xu X, Fu C, Lin J, Xu S, Li Q, Lei H. Protection of a New Heptapeptide from *Carapax trionycis* against Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice. *Chem Pharm Bull* 2013; 61(11):1130-1135.
- [245] Dong W, Lv B, Wei F, Yang L. Recombinant bovine pancreatic trypsin inhibitor protects the liver from carbon tetrachloride-induced chronic injury in rats. *Pharm Biol* 2013; 51(10):1298-1303.
- [246] Afzal M, Khan R, Kazmi I, Anwar F. Hepatoprotective potential of new steroid against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Mol Cell Biochem* 2013; 378(1-2):275-281.
- [247] Mihailović V, Katanić J, Mišić D, Stanković V, Mihailović M, Uskoković A, Arambašić J, Solujić S, Mladenović M, Stanković N. Hepatoprotective effects of secoiridoid-rich extracts from *Gentiana cruciata* L. against carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *Food Funct* 2014; 5(8):1795-803.
- [248] Kassuya CAL, Silvestre A, Menezes-de-Lima Jr. O, Marotta DM, Rehder VLG, Calixto JB. Antiinflammatory and antiallostatic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*: Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. *Eur J Pharmacol* 2006; 546(1-3):182-188.
- [249] Moreira ELG, Rial D, Jr ASA, Figueiredo CP, Siqueira JM, DalBó S, Horst H, de Oliveira J, Mancini G, dos Santos TS, Villarinho JG, Pinheiro FV, Marino-Neto J, Ferreira J, Bem AFD, Latini A, Pizzolatti MG, Ribeiro-Do-Valle RM, Prediger RDS. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2010; 117(12):1337-1351.
- [250] Kang M-C, Kang S-M, Ahn G, Kim K-N, Kang N, Samarakoon KW, Oh M-C, Lee J-S, Jeon Y-J. Protective effect of a marine polyphenol, dieckol against carbon tetrachloride-induced acute liver damage in mouse. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; 35(3):517-523.
- [251] Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(5): 960-967.
- [252] Sun W-Y, Wei W, Wu L, Gui S-Y, Wang H. Effects and mechanisms of extract from *Paeonia lactiflora* and *Astragalus membranaceus* on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 112(3):514-523.
- [253] Wasmuth H, Tacke F, Trautwein C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* 2010; 30(3):215-225.
- [254] Van Sweringen HL, Sakai N, Tevar AD, Burns JM, Edwards MJ, Lentsch AB. CXC chemokine signaling in the liver: impact on repair and regeneration. *Hepatology* 2011; 54(4):1445-1453.

-
- [255] Gerritsma JS, van Kooten C, Gerritsen AF, van Es LA, Daha MR. Transforming growth factor-beta 1 regulates chemokine and complement production by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 1998; 53(3):609-616.
- [256] Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, Marinos G, Lloyd AR. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol* 2003; 74(3):360-369.
- [257] Steib CJ, Bilzer M, Härtl JM, Beitingner F, Gülberg V, Göke B, Gerbes AL. Kupffer cell activation by hydrogen peroxide: a new mechanism of portal pressure increase. *Shock* 2010; 33(4):412-418.
- [258] Saiman Y et Friedman SL. The role of chemokines in acute liver injury. *Front Physiol* 2012; 3:213.
- [259] Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 617-648.
- [260] Miller MD et Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit. Rev. Immunol.* 1992; 12 (1-2):17-46.
- [261] Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(12):907-918.
- [262] Charo IF et Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354(6):610-621.
- [263] Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995; 270(45):27348-27357.
- [264] Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68(1):1-8.
- [265] Shibuta K, Mori M, Shimoda K, Inoue H, Mitra P, Barnard GF. Regional expression of CXCL12/CXCR4 in liver and hepatocellular carcinoma and cell-cycle variation during in vitro differentiation. *J Cancer Res* 2002; 93(7):789-797.
- [266] Hong F, Tuyama A, Lee TF, Loke J, Agarwal R, Cheng X, Garg A, Fiel MI, Schwartz M, Walewski J, Branch A, Schechter AD, Bansal MB. Hepatic stellate cells express functional CXCR4: role in stromal cell-derived factor-1alpha-mediated stellate cell activation. *Hepatology* 2009; 49(6):2055-2067.
- [267] Mukaida N. et Baba T. Chemokines in tumor development and progression. *Exp Cell Res* 2012; 318(2):95-102.
- [268] Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(9):597-606.
- [269] Jaeschke H et Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int* 2006; 26(8):912-919.
- [270] Aguilar-Valenzuela R, Carlsen ED, Liang Y, Soong L, Sun J. Hepatocyte growth factor in dampening liver immune-mediated pathology in acute viral hepatitis without compromising antiviral activity. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29(4):878-886.
- [271] Bozic CR, Gerard NP, von Uexkull-Guldenband C, Kolakowski LF, Conklyn MJ, Breslow R, Showell HJ, Gerard C. The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization. *J Biol Chem* 1994; 269(47):29355-29358.
- [272] Zimmermann A. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 (Suppl 4): iv6-10.
- [273] Wu J, Liu L, Yen RD, Catana A, Nantz MH, Zern MA. Liposome-mediated extracellular superoxide dismutase gene delivery protects against acute liver injury in mice. *Hepatology* 2004; 40(1):195-204.
- [274] El-Shabrawi MH, Kamal NM, Halawa FA, El-Guindi MA, Sobhy GA. Serum superoxide dismutase activity in acute and chronic paediatric liver diseases. *Arab J Gastroenterol* 2014; 15(2):72-75.
- [275] Broide E, Klinowski E, Koukoulis G, Hadzic N, Portmann B, Baker A, Scapa E, Mieli-Vergani G. Superoxide dismutase activity in children with chronic liver diseases. *J Hepatol* 2000; 32(2):188-192.

-
- [276] Depke M, Breitbach K, Dinh Hoang Dang K, Brinkmann L, Salazar MG, Dhople VM, Bast A, Steil L, Schmidt F, Steinmetz I, Völker U. Bone marrow-derived macrophages from BALB/C and C57BL/6 mice fundamentally differ in their respiratory chain complex proteins, lysosomal enzymes and components of antioxidant stress systems. *J Proteomics* 2014; 103:72-86.
- [277] Rashed MN. The role of trace elements on hepatitis virus infections: a review. *J Trace Elem Med Biol* 2011; 25(3):181-187.
- [278] Kalkan A, Bulut V, Avci S, Celik I, Bingol NK. Trace elements in viral hepatitis. *J Trace Elem Med Biol* 2002; 16 (4):227-230.
- [279] Nakashima H, Kinoshita M, Nakashima M, Habu Y, Shono S, Uchida T, Shinomiya N, Seki S. Superoxide produced by Kupffer cells is an essential effector in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2008; 48 (6):1979-1988.
- [280] Shin J W, Wang JH, Kim HG, Park HJ, Bok HS, Son CG. CGX, a traditional Korean medicine ameliorates concanavalin A-induced acute liver injury. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(12):3308-3315.
- [281] Yin X.-D, Jia P.-J, Pang Y, He J.-H. Protective Effect of FTY720 on Several Markers of Liver Injury Induced by Concanavalin A in Mice. *Curr Ther Res Clin Exp* 2012; 73(4-5):140-149.
- [282] Al-Shamsi M, Shahin A, Mensah-Brown EP, Souid A-K. Derangements of liver tissue bioenergetics in Concanavalin A-induced hepatitis. *BMC Gastroenterol* 2013; 13:6.
- [283] Carithers RL, Herlong HF, Diehl AM, Shaw EW, Combes B, Fallon HJ, Maddrey WC. Methylprednisolone therapy in patients with severe alcoholic hepatitis. A randomized multicenter trial. *Ann Intern Med* 1989; 110(9):685-690.
- [284] Mathurin P, O'Grady J, Carithers RL, Phillips M, Louvet A, Mendenhall CL, Ramond M.-J, Naveau S, Maddrey WC, Morgan TR. Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis: meta-analysis of individual patient data. *Gut* 2011; 60(2):255-260.
- [285] Zoorob RJ et Cender D. A different look at corticosteroids. *Am Fam Physician* 1998; 58(2):443-450.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

1- Publications :

Endougou Effa Anne Marie, Gantier Emilie, Hennebelle Thierry, Roumy Vincent, Rivière Céline, Dimo Théophile, Kamtchouing Pierre, Desreumaux Pierre, Dubuquoy Laurent. *Neoboutonia melleri* var *velutina* Prain: The aqueous stem bark extract protects from liver injury through radical scavenging properties. In progress.

Endougou Effa Anne Marie, Gantier Emilie, Hennebelle Thierry, Roumy Vincent, Rivière Céline, Dimo Théophile, Kamtchouing Pierre, Desreumaux Pierre, Dubuquoy Laurent. *Neoboutonia melleri* var *velutina* Prain: The aqueous stem bark extract is safe for acute treatment and contains a radical scavenging compound. In preparation.

2- Communications:

A.M. ENDOUGOU EFFA, E. GANTIER, L. DUBUQUOY, T. DIMO, P. KAMTCHOUING, P. DESREUMAUX. Evaluation of the hepatoprotective activity of a Cameroonian medicinal plant: *Neoboutonia velutina*. 18^{ème} colloque du comité camerounais des Biosciences 2011, Douala-Cameroun, présentation orale.

A.M. ENDOUGOU EFFA, E. GANTIER, L. DUBUQUOY, T. DIMO, P. KAMTCHOUING, P. DESREUMAUX. Etude de l'innocuité et des propriétés anti-inflammatoires hépatiques des extraits d'une plante médicinale camerounaise. 12^{ème} Journée André Verbert, colloque annuel des doctorants 2012, Lille-France, présentation orale.

A.M. ENDOUGOU EFFA. Evaluation des propriétés antioxydante et hépatoprotectrice d'une plante médicinale camerounaise. Doctoriales 2014, Lille-France, présentation poster.