

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

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

N° d'ordre :

N° de série:



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

HANFER Mourad

Intitulé :

**L'effet protecteur de la plante *Linaria tingitana*
(Scrophulariaceae) sur le dysfonctionnement
mitochondrial et lysosomal hépatocytaire
induit par l'acide valproïque chez le rat**

soutenu le : 12/07/2017

Devant le jury:

Président :	Pr. LALAOUI. K.	Université des Frères Mentouri, Constantine
Directeur de thèse :	Pr. AMEDDAH. S.	Université des Frères Mentouri, Constantine
Co-Directeur :	Dr. MORIN. D.	Directeur de recherche CNRS Université Paris-Est, Créteil, France
Examineurs :	Pr. LAHOUEL. M.	Université Mohammed Seddik Benyahia, Jijel
	Pr. DAHMANI. Y.	Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger

ANNÉE : 2016-2017

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dédicace

D'abord et avant tout je remercie Allah (Soit-il exalté), sans Lui cette thèse n'aurait pas vu le jour.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

A ma mère :

Pour m'avoir permis d'être ce que je suis qui m'a toujours poussé et motivé, grâce à elle j'ai pu tracer mon chemin et aboutir à mes objectifs, vos prières m'ont accompagné tout au long de ma vie. Maman j'aurais tellement aimé que tu sois auprès de nous aujourd'hui. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.

A mon père :

Qui n'a cessé d'investir financièrement, spirituellement pour ma formation et qui m'a encouragé à évoluer sur cette trajectoire. Papa, ces mots ne sauraient suffire pour te dire merci. Que Dieu te bénisse pour ton amour et ta patience.

A mes chers et adorable frères et sœurs. Merci pour l'amour fraternel et la chaleur que vous me procurez.

A ceux-là je dédis ce travail, en espérant qu'Allah Loué soit-Il éclairera nos esprits avant nos yeux, pour nous guider et illuminer nos cœur, pour qu'il nous montre la bonne voie afin d'aller à lui, et la mauvaise voie à éviter, Daigne t-Il, nous accepter parmi ses serviteurs fidèles, car Il écoute et Il exauce.

HANFER Mourad

Remerciements

« On ne se rend pas toujours compte à quel point ils peuvent être importants dans le travail et dans la vie jusqu'au jour où nos chemins se séparent »

Je remercie par avance ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Ils se reconnaîtront...

J'adresse en premier lieu mes vifs remerciements aux membres du jury pour l'honneur qui m'ont fait en acceptant de participer à ce jury de thèse. Je remercie le Professeur LALAOUI K. qui me fait l'honneur de présider ce jury. Mes remerciements également aux Professeurs DAHMANI. Y. et LAHOUEL. M. qui ont accepté d'examiner et de juger mon travail. Cela constitue pour moi à la fois un honneur et une grande joie.

Je tiens à remercier et à exprimer ma profonde gratitude à Professeur Souad AMEDDAH, directrice de cette thèse, pour son soutien et pour son encouragement tout au long de ce travail. Professeur Souad AMEDDAH je souhaite vous exprimer ma reconnaissance et mon profond respect. Votre présence dans ce jury constitue un honneur puisque vous étiez à l'origine de ce sujet.

C'est avec un grand plaisir que je témoigne ici toute ma reconnaissance à Monsieur le Docteur Didier MORIN qui a été mon co-directeur au cours de mon stage. Monsieur MORIN, merci pour m'avoir supporté et m'avoir guidé, pour votre disponibilité et votre bienveillance vous méritez ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance.

J'éprouve un profond respect pour Monsieur le Professeur Ahmed MANED pour son aide concernant les statistiques, pour m'avoir supporté et pour ses conseils qu'il n'a jamais hésité à me les donner avec un grand cœur généreux.

Je tiens à adresser mes remerciements au Professeur Bijan GHALEH-MARZBAN pour m'avoir accueilli dans son équipe avec beaucoup d'hospitalité et pour ses conseils tout au long de mon stage. Ainsi qu'à Alexandra D'Anglemont de Tassigny, Sandrine Pons et Hubert Dabire de l'équipe 3 de l'unité INSERM U955 c'était très agréable de travailler à vos côtés .

A Monsieur le Professeur Alain Berdeaux ex-directeur de l'équipe 3 l'unité INSERM U955 pour sa gentillesse, ses conseils, pour m'avoir appris à « lister mes priorités » et pour nos discussions sur divers sujets.

Mes remerciements vont également à Jérémie Borner, Julien Musman, Mathieu Panel, pour les bons moments partagés sur des périodes plus ou moins longues lors de mon stage. Je regrette déjà les moments que l'on a passés autour des « réunions », déjeuner, gâteaux, chocolats, etc....à raconter nos problèmes, nos joies, nos vacances, nos manips qui ne fonctionnent pas etc...

A Madame Sandrine Bonizec pour son aide et son soutien tout le long de mon stage, pour sa disponibilité à tout moment et pour son amitié.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe 18 de l'unité INSERM U955: Abdelhakim Ahmed-Belkacem pour m'avoir formé en culture cellulaire et pour sa gentillesse, Isaac Ruiz-Chavez, Quentin Nevers, Rozenn Brillet et Nazim Ahnou pour leur aide et pour m'avoir fourni les cellules HepG2.

Merci aussi à ceux qui se sont arrêté un instant dans leur parcours à la faculté de médecine de Créteil et dont la rencontre a été plus qu'un simple «bonjour-au revoir», le Dr Roberto Mottolini, Dr Roberta Foresti et Dr Rachid Souktani, Sylvie de la laverie et aux doctorants avec qui j'ai partagé cette année des bons moments Dr : Aniket Nikam, Xishan Ahmed, Sarah Kobeissi, Ihsan El Sayed, Shariq Abid.

Je tiens à remercier le Professeur LALAOUI Korichi, Président du Comité de Formation Doctorale (CFD) et responsable de la spécialité : Physio-Toxicologie Cellulaire.

A Professeur Zama Djamila merci pour votre immense générosité, je vous exprime ma totale reconnaissance.

Je tiens ensuite à remercier Dr Thamere Cheriet, Pr Ramdane Seghiri, Pr Samir Benayache, Pr Fadila Benayache de l'Unité de Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et analyse Physicochimiques et Biologiques que j'ai côtoyées au cours de la thèse pour la fourniture des extraits végétales.

Je remercie également Dr Thamere Cheriet et Pr Ratiba Mekkiou de leur participation pour m'aider à rédiger la publication, merci pour la gentillesse et la disponibilité.

A Amel l'ingénieur de Laboratoire de Biologie et Environnement pour son aide précieuse, gentillesse et bonne humeur. Je vous remercie pour votre sympathie et convivialité.

A tous mes collègues doctorants de Physio-Toxicologie Cellulaire et les autres spécialités. Merci pour votre soutien dans les jours « où on est persuadé qu'on y arrivera jamais ».

A Dr Idir Aliane et Dr Yazid Delenda. Je vous remercie grandement pour l'aide que vous m'avez apporté concernant le logiciel Latex pour finir ce travail. Sachez que vous m'avez aidé bien plus que vous ne le pensez.

Un Merci tout particulier à Charaf : je tiens à te remercier et à te faire part de toute ma gratitude pour le soutien moral que tu m'as apporté. Une chose est sûre : je n'oublierais jamais les moments qu'on a passé à Constantine (Firma et Mentouri) à Marseille et à Paris.

*J'adresse mes chaleureux remerciements à toute la famille **HANFER**, mes frères, mes sœurs, mes belles sœurs et mes beaux-frères pour avoir bien pris soin de moi pendant toutes mes études, leur sympathie et leurs encouragements qu'ils m'ont apporté. Ceux qui sont toujours là pour moi et pour qui je serai toujours là aussi.*

J'adresse un clin d'œil à mes neveux et mes nièces pour tous les moments de joie et de rigolade.

Je ne saurais terminer sans remercier l'ensemble de mes collègues de travail (à l'université de Constantine, à l'université de Batna et à l'EPH Ali N'mer) ainsi que mes amis, pour leur patience, leurs encouragements, et leurs soutiens multiformes, et ceux qui m'ont soutenu aussi en dehors du labo, ceux qui savent dire les mots qu'il faut au moment où il faut. Je leur témoigne ma profonde affection, car ce travail est en partie le fruit de leur soutien. Je leur suis très reconnaissant. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.

Liste des abréviations

ACP	Acid phosphatase
AO	Acridine orange
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Acides gras
AIF	Apoptosis inducing factor
ALP	Alkaline phosphatase
ANT	Tranlocase des nucléotides adényliques
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
AVP	Acide valproïque
AVP-CoA	Valproyl-CoA
Bcl	B-cell lymphoma
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
CAT	Catalase
CDNB	1-chloro-2,4 dinitrobenzene
CK18	Cytokératine 18
CMA	Chaperone-mediated autophagy
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CoA	Coenzyme A
CoQ	Coenzyme Q
CPT	Carnitine palmitoyl-transférase
CYP450	Cytochrome P 450
Cyt	Cytochrome

DCIP	2,6-Dichlorophénol Indophénol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle
DTNB	Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid
EGTA	Ethylene glycol tetra acetic acid
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
Extrait AcOEt	Extrait d'acétate d'éthyle
Extrait CHCl₃	Extrait de chloroforme
Extrait <i>n</i>-BuOH	Extrait de n-butanol
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADH	Flavine adénine dinucléotide
FADH₂	Flavine adénine dinucléotide réduit
FMN	Flavine mono nucléotide
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GPx	Glutathion peroxydase
GSSG	Glutathion disulfure oxydé
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
I %	Pourcentage d'inhibition
IC₅₀ %	Concentration inhibitrice de 50 %
ICE	Interleukine converting enzyme
IL	Interleukine
LAMP	Protéine membranaire associées aux lysosomes
LIMP	Lysosomal-integral membrane protein
LMPs	Lysosomal membrane proteins
LLeMe	L-Leucine-methyl-ester-hydrochloride

MDA	Malonyldialdéhyde
MeOH	Méthanol
Mn-SOD	Superoxyde dismutase mitochondrial
MPO	Myéloperoxydase
NAD⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NO[°]	Oxyde nitrique (monoxyde d'azote)
NOS	NO synthase
O₂^{°-}	Radical anion superoxyde
°OH	Radical anion hydroxyde
ONOO-	Peroxynitrite
PLA2	Phospholipase A2
PTPm	Pores de transition de la perméabilité mitochondriale
RE	Réticulum endoplasmique
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Thiobarbituric acid
TBARS	Thiobarbituric acid-reactive substances
TCA	Acide trichloroacétique
TGF-β	Transforming growth factor bêta
TIM	Translocase intermembranaire
TNF-α	Tumor necrosis factor
UQ	Ubiquinone
VDAC	Voltage -dependent anion channel
Vit E	Vitamine E

XO	Xanthine oxidase
$\Delta\Psi_m$	Potentiel électrique
2-ène-AVP	Acide 2-n-propyl-(E)-2-penténoïque
2,4-diène AVP	Acide 2-n-propyl-(E)-2,4-pentadiénoïque
3-ène-AVP	Acide 2-propyl-3-pentanoïque
3-OH-AVP	Acide 3-hydroxy-2-propylpentanoïque
3-céto-AVP	Acide 3-oxo-2-propylpentanoïque
4-ène-AVP	Acide 2-propyl-4-pentanoïque
4-céto-AVP	Acide 4-oxo-2-propylpentanoïque
4-OH-AVP	Acide 4-hydroxy-2-propylpentanoïque
5-OH-AVP	Acide 5-hydroxy-2-pentanoïque
4-HNE	4-hydroxynonéal

Liste des figures

1.1	Structure chimique de l'acide valproïque (AVP).	9
1.2	La plante <i>Valeriana officinalis</i>	10
1.3	La β -oxydation de l'AVP dans la mitochondrie de foie de rat.	12
1.4	Principales voies de biotransformation de l'AVP.	13
1.5	Mécanismes proposé de l'hépatotoxicité induite par l'AVP.	16
2.1	Représentation schématique de la structure mitochondriale.	25
2.2	Le transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale.	26
2.3	La production d'énergie via la β -oxydation et le cycle de Krebs.	28
2.4	Les différentes fonctions de la mitochondrie.	29
2.5	La production mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène.	30
2.6	Mécanismes d'inhibition de la β -oxydation mitochondriale des AG par l'AVP.	33
2.7	Conséquences métaboliques d'une inhibition sévère de la β -oxydation mitochondriale des acides gras.	34
3.1	Lysosomes primaires et secondaires.	44
3.2	Les voies d'approvisionnement des lysosomes.	47
3.3	Régulation de la fonction lysosomale par mTORC1 dans les conditions normales et de durant le jeûne.	49
3.4	Les voies autophagiques et hétérophagiques.	50
3.5	L'implication des lysosomes au processus de la mort cellulaire.	52
3.6	Mécanisme proposé pour le dysfonctionnement lysosomal induit par l'AVP.	55
4.1	Classification botanique de l'espèce <i>Linaria tingitana</i> Boiss. & Reut.	70

5.1	Macération et extraction des parties aériennes de <i>Linaria tingitana</i> Boiss. & Reut.	83
5.2	Schéma de principe de l'électrode de Clark.	104
5.3	Consommation d'oxygène par les mitochondries dans différentes conditions.	105
6.1	Le profile LC-MS de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> (1).	121
6.2	Le profile LC-MS de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> (2).	121
6.3	L'activité antioxydante des trois extraits de <i>L. tingitana</i> : CHCl ₃ , AcOEt et <i>n</i> -BuOH vis-à-vis le radical DPPH°.	122
6.4	Effet chélateur des trois extraits <i>n</i> -BuOH, EtOAc et CHCl ₃ de <i>L. tingitana</i>	123
6.5	Test de blanchissement de β -carotène.	124
6.6	Pouvoir réducteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i>	125
6.7	L'effet scavanger de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> contre le radical (NO).	125
6.8	Effet de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> sur l'inhibition de la dénaturation de l'albumine.	126
6.9	Effet de la phase <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> sur la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC).	127
6.10	Effet anti-inflammatoire de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> sur l'œdème de la patte du rat induit par la carragénine.	128
6.11	Effet anti-inflammatoire de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> sur l'activité de la MPO dans les tissus des pattes des rats.	129
6.12	Effet anti-inflammatoire de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> sur la production de MDA dans les tissus des pattes des rats.	130
6.13	Des micro-photographies de l'analyse histopathologique, représentent l'effet anti-inflammatoire sur les pattes des rats co-traités oralement par l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i>	131
6.14	Effet anti-inflammatoire de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> sur la péritonite induite par le carragénine.	132
6.15	Effet anti-inflammatoire de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> sur la production d'oxyde nitrique (NO) dans la cavité péritonéale des rats.	132

6.16	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> (200 mg/kg) sur le niveau sérique des enzymes ALT et AST dans le foie des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).	134
6.17	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> (200 mg/kg) sur le niveau sérique des enzymes ALP et LDH dans le foie des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).	135
6.18	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> (200 mg/kg) sur le niveau sérique de la bilirubine totale dans le foie des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).	136
6.19	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> (200 mg/kg) sur le profil lipidique chez des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).	137
6.20	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> (200 mg/kg) sur le taux de MDA dans le foie chez des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).	138
6.21	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> (200 mg/kg) sur l'activité des enzymes antioxydants. (A): CAT et (B): SOD dans le foie chez des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).	139
6.22	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> (200 mg/kg) sur le système glutathion cytosolique dans le foie chez des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).	140
6.23	L'analyse histopathologique : l'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> vis-à-vis l'hépatotoxicité induite par l'AVP.	141
6.24	Etude de l'effet de concentrations croissantes d'AVP sur la viabilité cellulaire des cellules HepG2.	142
6.25	Effet des molécules extraites de <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> sur la mortalité des cellules HepG2 induite par 10 mM d'AVP.	143
6.26	Effet des molécules extraites de <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> sur la mortalité des cellules HepG2 induite par 10 mM d'AVP.	144
6.27	Mesure au moyen d'une sonde fluorescente, le carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacétate (carboxy-H ₂ DCFDA), de la production d'ERO induits par l'AVP sur les cellules HepG2.	145
6.28	Mesure au moyen d'une sonde fluorescente, le carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacétate (carboxy-H ₂ DCFDA), de la production d'ERO induits par l'H ₂ O ₂ sur les cellules HepG2.	146

6.29	Effet des molécules extraites de <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> sur la production des ERO induite par l'AVP sur les cellules HepG2.	146
6.30	Mesure de la consommation d'oxygène.	148
6.31	Effet de l'AVP sur le contrôle respiratoire (RCR).	149
6.32	Mesure de la consommation d'oxygène en présence de FCCP.	150
6.33	Mesure de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.	151
6.34	Mesure de la production mitochondriale d'H ₂ O ₂ (1).	152
6.35	Mesure de la production mitochondriale de l'H ₂ O ₂ (2).	152
6.36	Mesure de la production mitochondriale de l'H ₂ O ₂ (3).	153
6.37	L'effet de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> (200 mg/kg) sur la variation des taux de MDA et des enzymes antioxydants mitochondriale des hépatocytes chez les rats traités par l'AVP (400 mg/kg).	154
6.38	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> (200 mg/kg) sur la variation des taux de MDA et de SOD lysosomals dans les hépatocytes des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).	155
6.39	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>L. tingitana</i> (200 mg/kg) sur la variation des activités des enzymes lysosomales dans les hépatocytes des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).	157
6.40	Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes induite par l'AVP sur les cellules HepG2.	158
6.41	Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes induite par la LLoMe sur les cellules HepG2.	158
6.42	Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes sur les cellules HepG2.	159
6.43	Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes sur les cellules HepG2.	160

Liste des tableaux

4.1	Classification de la famille Scrophulariaceae [44].	65
6.1	Résultats des tests préliminaires des compositions chimiques des parties aériennes de <i>L. tingitana</i>	120
6.2	Teneur en polyphénols totaux et des flavonoïdes.	120

Table des Matières

Liste des abréviations	viii
Introduction générale	1
I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1 L'acide valproïque	9
1.1 L'acide valproïque	9
1.2 Absorption	10
1.3 Distribution	11
1.4 Métabolisme	11
1.5 Élimination	14
1.6 Hépatotoxicité induite par l'acide valproïque	14
2 Mitochondrie et dysfonctionnement mitochondrial induit par l'AVP	21
2.1 La mitochondrie	21
2.2 Structure mitochondriale	21
2.3 Les fonctions de la mitochondrie	25
2.3.1 La production d'énergie	25
2.3.1.1 La chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative	25
2.3.1.2 Oxydation des acides gras	26
2.3.1.3 Le cycle de Krebs	27
2.3.2 Mort/survie cellulaire	28
2.3.3 Mitochondrie et stress oxydant	29
2.4 Dysfonctionnement mitochondrial induit par l'AVP	32

2.4.1	Dysfonctionnement mitochondrial induit par l'AVP et stéatose hépatique	32
2.4.2	Dysfonctionnement mitochondrial induit par l'AVP et stress oxydant . . .	35
3	Lysosome et dysfonctionnement lysosomal induit par l'AVP	43
3.1	Les lysosomes	43
3.2	Types des lysosomes	44
3.3	Composition chimique	45
3.3.1	Les enzymes hydrolytiques	45
3.3.2	Les cathepsines	45
3.3.3	Les hexosaminidase	46
3.4	Rôles des lysosomes	47
3.4.1	Les voies autophagiques	48
3.4.2	Les voies hétérophagiques	50
3.5	Les lysosomes et la mort cellulaire	51
3.6	Lysosome et stress oxydant	53
3.7	Interaction entre les dysfonctionnements lysosomals et mitochondriaux	53
3.8	Dysfonctionnement lysosomal induit par l'AVP	54
4	Produits naturels et atteintes hépatiques	61
4.1	Produits naturels et atteintes hépatiques	61
4.1.1	Produits naturels et dysfonctionnement mitochondrial	62
4.1.2	Produits naturels et dysfonctionnement lysosomal	63
4.2	Description de la famille Scrophulariaceae	65
4.3	Description du genre <i>Linaria</i>	65
4.3.1	Propriétés pharmacologiques et utilisation en médecine traditionnelle . . .	66
4.3.2	Données phytochimiques et activités biologiques	66
4.3.3	Les principales classes de composés secondaires	67
4.3.3.1	Les terpénoïdes	67
4.3.3.2	Les polyphénols	68
4.3.3.3	Les alcaloïdes	69
4.4	L'espèce <i>Linaria tingitana</i>	70

II	PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	79
5	Matériels et méthodes	81
5.1	Matériel végétal et screening phytochimique	81
5.1.1	Criblage phytochimique préliminaire	81
5.1.2	Préparation des extraits	82
5.1.3	Dosage des polyphénols totaux	82
5.1.4	Dosage des flavonoïdes	82
5.1.5	Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	84
5.2	Screening biologique	85
5.2.1	Évaluation de l'activité antioxydante	85
5.2.1.1	Effet anti-radicalaire par le test au DPPH°	85
5.2.1.2	Effet chélateur du fer ferreux	85
5.2.1.3	Test de blanchissement de β -carotène	86
5.2.1.4	Pouvoir réducteur du Fer	87
5.2.1.5	Effet scavenger de l'oxyde nitrique (NO°)	87
5.2.2	Évaluation de l'activité anti-inflammatoire	88
5.2.2.1	Inhibition de la dénaturation de l'albumine	88
5.2.2.2	Stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC)	88
5.2.2.3	Induction de l'œdème dans la patte par la carragénine	89
5.2.2.3.1	Mesure de l'activité de myéloperoxydase (MPO)	90
5.2.2.3.2	Dosage de malondialdéhyde (MDA)	90
5.2.2.3.3	Étude histologique	91
5.2.2.4	Péritonite induite par la carragénine	91
5.2.2.4.1	Détermination du taux du (NO)	92
5.3	Évaluation de l'activité antioxydante et hepatoprotective	92
5.3.1	Évaluation de la fonction hépatique	92
5.3.1.1	Animaux et protocole d'expérimentation	92
5.3.1.2	Marqueurs de l'hépatotoxicité	93
5.3.1.3	Évaluation de lipidogramme et stéatose hépatique	95

5.3.1.4	Évaluation du statut oxydant cytosolique	97
5.3.1.4.1	La peroxydation lipidique	98
5.3.1.4.2	Dosage de la catalase (CAT) cytosolique	98
5.3.1.4.3	Dosage de la superoxyde dismutase (SOD) cytosolique	98
5.3.1.4.4	Dosage du glutathion réduit (GSH) cytosolique	99
5.3.1.4.5	Dosage du glutathion réductase (GR) cytosolique	99
5.3.1.4.6	Dosage du glutathion-S-transférase (GST) cytosolique	100
5.3.1.4.7	Dosage du glutathion peroxydase (GPx) cytosolique	100
5.3.1.5	Étude histologique	100
5.3.2	Évaluation de l'effet des iridoïdes sur la lignée cellulaire HepG2 traitée par l'AVP	100
5.3.2.1	Mesure de la viabilité cellulaire (MTT)	101
5.3.2.2	Mesure de la production des espèces réactives de l'oxygène	102
5.4	Évaluation du dysfonctionnement mitochondrial	103
5.4.1	Étude <i>in vitro</i> sur des mitochondries hépatiques isolées	103
5.4.1.1	Isolement des mitochondries du foie	103
5.4.1.2	Mesure de la consommation d'oxygène	104
5.4.1.3	Mesure de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale	106
5.4.1.3.1	Complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase)	106
5.4.1.3.2	Complexe II (Succinate déshydrogénase)	107
5.4.1.3.3	Complexe III (Ubiquinol cytochrome <i>c</i> oxydoréductase)	107
5.4.1.3.4	Complexe IV (Cytochrome <i>c</i> oxydase)	108
5.4.1.4	Mesure de la production mitochondriale de H ₂ O ₂	108
5.4.2	Étude du dysfonctionnement mitochondrial <i>in vivo</i>	109
5.4.2.1	Évaluation du statut oxydant mitochondrial	109
5.5	Évaluation du dysfonctionnement lysosomal	110
5.5.1	Évaluation du statut oxydant lysosomal	110
5.5.2	Évaluation des enzymes lysosomales	110
5.5.2.1	Mesure de la myéloperoxydase (MPO) hépatique	110
5.5.2.2	Dosage de l'activité enzymatique lysosomale	110

5.5.2.2.1	La phosphatase acide (ACP)	110
5.5.2.2.2	La β -N-acetylglucosaminidase (β -NAG)	111
5.5.2.2.3	La Cathepcine-D	111
5.5.2.2.4	La β -glucoronidase (β -GLU)	111
5.5.3	Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes	111
5.6	Analyses statistiques	112
III	RESULTATS ET DISCUSSION	117
6	Résultats	119
6.1	Screening phytochimique	119
6.1.1	Criblage phytochimique préliminaire	119
6.1.2	Dosage des polyphenols et des flavonoïdes	119
6.1.3	Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	120
6.2	Screening biologique	122
6.2.1	Évaluation de l'activité antioxydante	122
6.2.1.1	Effet scavenger du radical DPPH°	122
6.2.1.2	Le pouvoir chélateur ferreux	123
6.2.1.3	Test de blanchissement de β -carotène	123
6.2.1.4	Pouvoir réducteur	124
6.2.1.5	Activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO)	125
6.2.2	Évaluation de l'activité anti-inflammatoire	126
6.2.2.1	Inhibition de la dénaturation de l'albumine	126
6.2.2.2	Stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC)	127
6.2.2.3	Détermination du volume de l'œdème de la patte induit par la carragénine	127
6.2.2.4	Activité de la myéloperoxydase (MPO) dans les tissus des pattes	129
6.2.2.5	Taux de malondialdéhyde (MDA) dans les tissus des pattes	129
6.2.2.6	Étude histologique	130
6.2.2.7	Péritonite induite par la carragénine	131
6.2.2.8	Taux du NO dans la cavité péritonéale	132

6.3	Évaluation de l'activité antioxydante et hépatoprotectrice	134
6.3.1	Marqueurs de l'hépatotoxicité	134
6.3.2	Évaluation de lipidogramme et steatose hépatique	136
6.3.3	Évaluation du statut oxydant cytosolique	138
6.3.3.1	La peroxydation lipidique	138
6.3.3.2	Activité enzymatique de CAT et SOD cytosolique	138
6.3.3.3	Activité enzymatique de système glutathion cytosolique	139
6.3.4	Étude histologique	140
6.3.5	Évaluation de l'effet des irridoides sur la lignée cellulaire (HepG2) traitée par l'AVP	142
6.3.5.1	Mesure de la viabilité cellulaire	142
6.3.5.2	Mesure de la production des espèces réactives de l'oxygène	145
6.4	Évaluation du dysfonctionnement mitochondriale	148
6.4.1	Étude <i>in vitro</i> sur des mitochondries hépatiques isolées	148
6.4.1.1	Phosphorylation oxydative	148
6.4.2	Activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale	151
6.4.3	Production mitochondriale d'H ₂ O ₂	152
6.4.4	Évaluation du statut oxydant mitochondriale	153
6.5	Évaluation du dysfonctionnement lysosomal	155
6.5.1	Évaluation du statut oxydant lysosomal	155
6.5.2	Évaluation des enzymes lysosomales	156
6.5.3	Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes	158
7	Discussion	163
	Conclusion et perspectives	199

Introduction générale

La mitochondrie, qui joue un rôle déterminant dans l'homéostasie cellulaire, représente une cible privilégiée pour certains médicaments tels l'antiépileptique valproate de sodium [1]. Le mécanisme exact de la toxicité induite par l'acide valproïque (AVP) reste une source de débat [2], seulement il a été rapporté que son effet hépatotoxique se manifesterait principalement via le dysfonctionnement mitochondrial [3]. Les altérations mitochondriales hépatiques induites par l'AVP impliqueraient plusieurs métabolismes et de nombreux constituants mitochondriaux qui aboutiraient ultérieurement à diverses conséquences néfastes telles le déficit énergétique, la stéatose, la mort cellulaire, ceci via un ensemble multivarié de mécanismes [4,5,6]. L'inhibition du transfert des électrons dans la chaîne respiratoire provoque une formation accrue d'espèces réactives d'oxygène (ERO) et un stress oxydant qui amplifient les lésions cellulaires via l'oxydation et l'altération des protéines impliquées dans l'ouverture des pores de transition de la perméabilité mitochondriale (PTPm) [7,8,9]. Ceci entraîne par la suite une cascade d'événements délétères au sein des hépatocytes se traduisant par un phénomène de nécrose, d'apoptose ou de nécroptose [10].

Des études récentes ont signalé que l'exposition des hépatocytes à l'AVP augmente la fragilité des membranes lysosomales suite à la formation des ERO intracellulaires tels le radical anion hydroxyde ($^{\circ}\text{OH}$) [11]. Au niveau de l'environnement acide du lysosome, le ($^{\circ}\text{OH}$) résultant pourrait déstabiliser l'intégrité de la membrane lysosomale et libérer les protéases digestives en modifiant directement les membranes mitochondriales externes, ou indirectement en activant les protéines proapoptotiques Bax, la Bid et d'autres enzymes lytiques [12]. Les lysosomes jouent des rôles fondamentaux dans différents types de mort cellulaire : la nécrose (sortie des hydrolases), l'apoptose (protéines proapoptotiques), l'autophagie (stabilisation de la membrane lysosomale). Les mitochondries et le compartiment lysosomal sont, donc, considérés comme un objectif pharmacologique intéressant offrant de nouvelles approches thérapeutiques. A cause de

la multitude des voies impliquées dans les dysfonctionnements mitochondriaux/lysosomaux hépatiques, l'étude progressive de ces voies permettrait de concevoir des stratégies pharmacologiques appropriées aidant à moduler d'une manière plus efficace ces dysfonctionnements.

Malgré le nombre de composés bioactifs qui existent, il reste nécessaire de découvrir des composés thérapeutiques et protecteurs originaux actifs sur ces voies. Notre investigation s'intéresse à étudier les effets modulateurs de la plante *Linaria tingitana* (Scrophulariaceae) vis-à-vis un dysfonctionnement mitochondrial/lysosomal hépatocytaire chez le rat traité par l'AVP. Selon la littérature, aucune étude biologique n'a été réalisée avec l'espèce *L. tingitana*.

L'exploration de la plante (*Linaria sp.*) en tant que sources de substances naturelles actives dont les structures chimiques sont à identifier (les composés phénoliques, les irridoïdes) permet d'envisager les hypothèses aidant à déterminer la relation structure/effet de cette espèce et de leur molécules impliquées dans la modulation du dysfonctionnement mitochondrial/lysosomal induit par l'AVP.

La connaissance progressive des voies impliquées dans le dysfonctionnement mitochondrial/lysosomal hépatiques induits par l'AVP permettant de concevoir les stratégies protectrices de *L. tingitana* dans la modulation efficace de ces dysfonctionnements nécessite l'évaluation du potentielle antioxydant et anti-inflammatoire des fractions et des molécules bioactives issues de cette espèce.

La compréhension des interactions avec la cascade d'événements délétères au sein des mitochondries et des lysosomes hépatocytaires en découvrant où les substances bioactives possédant des propriétés modulateurs aidera à prévenir ou même à retarder l'apparition des complications liées au dysfonctionnement mitochondrial, lysosomal (apoptose, nécrose, nécroptose).

Afin d'illustrer les différentes hypothèses concernant les effets protecteurs probables de *L. tingitana*, la présente étude adoptera plusieurs étapes expérimentales. Cette étude porte sur la phase butanolique de l'espèce *L. tingitana* ainsi que sur les molécules purifiées en effectuant des analyses spectroscopiques, en collaboration avec l'Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Physico-Chimique et Biologique (VARENBIOMOL). Afin d'atteindre les objectifs conçus par notre hypothèse de travail nous avons adopté la démarche suivante :

- Screening phytochimique: extraction, criblage phytochimique préliminaire et analyse qualitative et quantitative en utilisant l'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à

la spectrométrie de masse (LC-MS), afin de déterminer le profil chimique de la plante *L. tingitana*.

- Screening biologique: valorisation du potentiel biologique antioxydant et anti-inflammatoires de *L. tingitana*.
- Evaluation de l'activité hepatoprotective de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* sur un modèle de rat traité par l'AVP, cette partie est conçue également pour étudier les mécanismes d'action *in vivo* et tester l'efficacité antioxydante (statut redox, stress oxydant) et modulatrice de la stéatose (lipidogramme).
- Evaluation *in vitro* (modèle des lignées cellulaires hépatiques : HepG2) de l'interaction des molécules extraites de l'extrait *n*-BuOH avec la toxicité induite par l'AVP et la détection de la production des ERO au moyen d'un composé fluorescent le carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacétate (carboxy-H₂DCFDA).
- Evaluation du dysfonctionnement mitochondrial induit par l'AVP (*in vitro* : isolats mitochondriaux en mesurant l'effet inhibiteur de la phosphorylation oxydative mitochondriale, de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la production des ERO et l'évaluation (*in vivo* : fraction mitochondriale) le stress oxydatif.
- Evaluation de dysfonctionnement lysosomal induit par l'AVP en mesurant *in vivo* le stress oxydant et de l'intégrité de la membrane lysosomale et *in vitro* (HepG2) la stabilité des membranes lysosomales au moyen d'un composé fluorescent, l'acridine orange.

Références bibliographiques

- [1] Johannessen SI, Landmark CJ. Antiepileptic Drug interactions-principles and clinical implications. *Curr Neuropharmacol*. 2010; 8:254-267.
- [2] Komulainen T, Lodge T, Hinttala R, et al. Sodium valproate induces mitochondrial respiration dysfunction in HepG2 in vitro cell model. *Toxicology*. 2015; 331:47-56.
- [3] Tong V, Teng XW, Chang TKH, Abbott FS. Valproic acid II: effects on oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and cytotoxicity in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicol Sci*. 2005; 86:436-443.
- [4] Tong V, Teng XW, Chang TKH, Abbott FS. Valproic acid I: time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats. *Toxicol Sci*. 2005; 86:427-435.
- [5] Zhang B, Wang X, Nazarali AJ. Ascorbic acid reverses valproic acid-induced inhibition of *hoxa2* and maintains glutathione homeostasis in mouse embryos in culture. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30:137-148.
- [6] Begriche K, Massart J, Robin MA, et al. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol*. 2011; 54:773-794.
- [7] Ponchaut S, van Hoof F, Veitch K. In vitro effects of valproate and valproate metabolites on mitochondrial oxidations. Relevance of CoA sequestration to the observed inhibitions. *Biochem Pharmacol*. 1992; 43:2435-2442.
- [8] Ponchaut S, Veitch K. Valproate and mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 1993; 46:199-204.
- [9] Esposito LA, Melov S, Panov A, et al. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:4820-4825.
- [10] Kiang TK, Teng XW, Surendraddoss J, et al. Glutathione depletion by valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes: Role of biotransformation and temporal relationship with onset of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011; 252:318-324.
- [11] Pourahmad J, Eskandari MR, Kaghazi A, et al. A new approach on valproic acid induced hepatotoxicity: involvement of lysosomal membrane leakiness and cellular proteolysis. *Toxicol in Vitro*. 2012; 26:545-551.

[12] Pourahmad J, Ross S, O'Brien PJ. Lysosomal involvement in hepatocyte cytotoxicity induced by Cu(2+) but not Cd(2+). *Free Radic Biol Med.* 2001; 30:89-97.

Première Partie

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

L'acide valproïque

1.1 L'acide valproïque

L'acide valproïque (AVP), également appelé valproate de sodium, acide 2-propylpentanoïque ($C_8H_{16}O_2$) (Figure 1.1) ou acide n-dipropylacétique [1], est un acide gras (AG) ramifié à courte chaîne qui dérive de l'acide valérique isolé des rhizomes de la valériane (*Valeriana officinalis*) (Figure 1.2) de la famille des Valérianacées. Il a été produit pour la première fois en 1882 comme solvant organique [2]. Son potentiel thérapeutique a été découvert fortuitement en 1963 lorsque Carraz et ses collègues ont utilisé l'AVP comme solvant pour les anticonvulsivants et reconnu expérimentalement que l'AVP avait lui-même une activité anticonvulsivante [3].

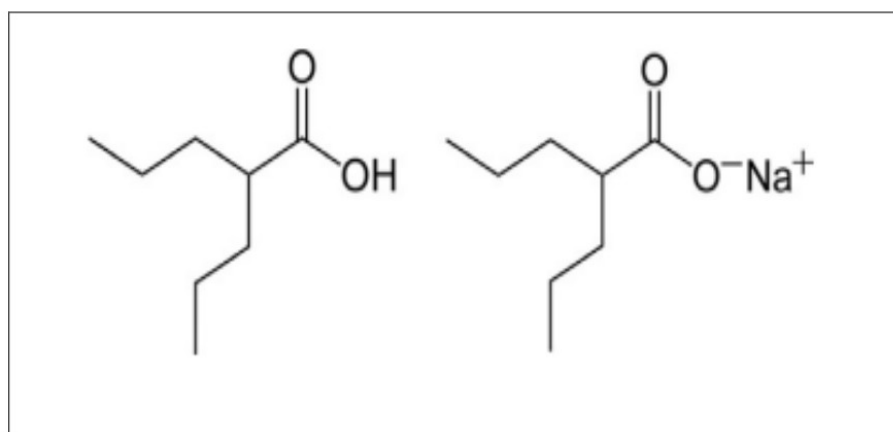


Figure 1.1: Structure chimique de l'acide valproïque (AVP).



Figure 1.2: La plante *Valeriana officinalis*.
(https://fr.wikipedia.org/wiki/Val%C3%A9riane_officinale)

L'AVP est aujourd'hui commercialisé sous plusieurs noms (Dépakine[®], Dépakote[®], Dépakine Chrono[®], Micropakine[®]). Il est utilisé comme antiépileptique dans le traitement de formes variées d'épilepsies partielles ou généralisées ou en psychiatrie comme thymorégulateur [4]. Il est aussi prescrit dans les cas de troubles bipolaires de l'humeur [5]. L'efficacité thérapeutique est généralement obtenue pour des concentrations sériques de 40-50 mg/l, la fourchette thérapeutique est comprise entre 40 et 100 mg/l alors que le seuil toxique se situe au-delà de 200 mg/l [6].

D'un point de vue pharmacocinétique les propriétés de l'AVP sont principalement déterminées par le mode d'administration et les conditions du patient (particulièrement l'âge) [7].

1.2 Absorption

Après administration orale, l'absorption digestive est rapide et quasi-complète, et le pic plasmatique est atteint en une à deux heures, et entre trois et huit heures pour les formes à libération prolongée. L'alimentation entraîne une absorption retardée mais ne diminue pas l'importance de celle-ci [6]. La biodisponibilité sanguine de l'AVP est de plus 80% et sa demi-vie chez l'être humain est de 8 à 14 h, chez le rat 2h et 30 min chez la souris [6,8].

1.3 Distribution

L'AVP a un pKa de 4,56 et est donc fortement ionisé au pH physiologique [9]. Il présente une bonne diffusion dans le système nerveux central. Ainsi, une quantité relativement faible est distribuée par diffusion passive dans les tissus, car seules les parties solubles non-ionisées dans les lipides diffusent à travers les membranes [10]. Le volume de distribution de l'AVP est d'environ 0,14 l/kg chez l'homme, indiquant qu'il est principalement limité à la circulation et aux liquides extracellulaires [11].

Dans le sérum, une forte proportion (70 – 94%) de l'AVP est liée aux protéines sériques principalement l'albumine [12]. Cette liaison diminue avec l'augmentation des concentrations du médicament et elle devient aussi plus faible chez les patients âgés et les femmes enceintes, et en présence de quantités croissantes d'AG libre dans le sérum [13]. Chez le rat cette liaison est faible (12%) [14].

1.4 Métabolisme

Il est admis que l'AVP est presque uniquement métabolisé par le foie qui est l'organe cible dominant de la toxicité du valproate. Le sort métabolique de l'AVP est très complexe et conduit à la production de plus de 50 métabolites différents [15]. Il suit trois principales voies : la glucuronidation, la β -oxydation mitochondriale et le métabolisme oxydatif catalysé par le cytochrome P450 (CYP450). Dont il subit généralement des réactions d'oxydation, principalement de réduction et d'hydrolyse, puis des réactions de conjugaison comprenant la glucuro-conjugaison qui est la réaction dominante, la conjugaison avec la carnitine, le glutathion, le coenzyme-A (CoA) ou avec un acide aminé comme la glycine ou le glutamate. Les conjugués formés sont très hydrophiles, ce qui favorise leur excrétion.

En raison de sa configuration moléculaire qui est très proche de celle des AG à chaîne moyenne, l'AVP entre en compétition avec eux lors de leur transport intracellulaire, de leur métabolisme intramitochondrial et de leur élimination et il suit exactement le même processus que les AG avec lesquels il interfère [6]. Le mécanisme utilisé par l'AVP pour traverser la membrane mitochondrial n'est pas encore clairement défini mais un processus indépendant de la carnitine semble être le plus probable. Dans les mitochondries hépatiques, l'AVP est oxydé par

la β -oxydation (Figure 1.3) et utilise les quatre premières étapes enzymatiques des AG [6]. Sa biotransformation implique l'activation de l'AVP en valproyl-CoA (AVP-CoA) par l'acyl-CoA synthétase [7] et la dernière étape aboutit à deux métabolites terminaux : le propionyl-CoA et le pentanoyl-CoA (Figure 1.3) [16].

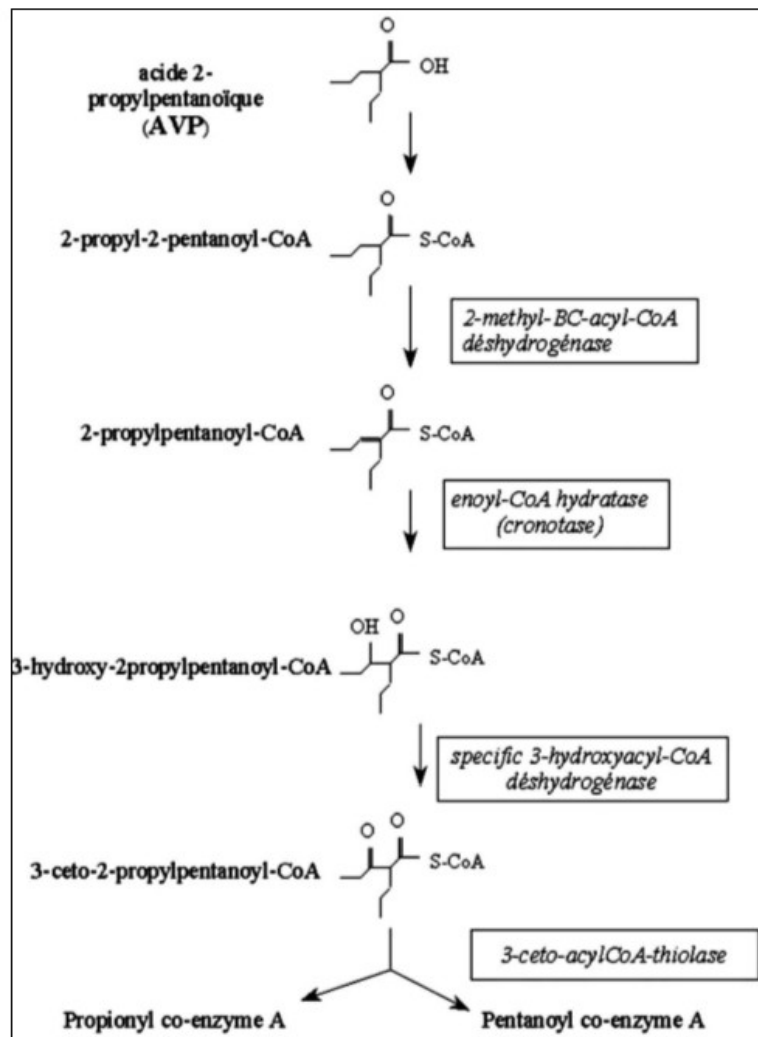


Figure 1.3: La β -oxydation de l'AVP dans la mitochondrie de foie de rat. [6]

Toutefois avant l'oxydation, le composé mère peut subir une déshydrogénation microsomale par le CYP450 plus précisément par les isoformes CYP2C9, CYP2A6 [17] et CYP2B6 [15], pour former l'acide 2-propyl-4-penténoïque (4-ène-AVP) (figure 1.4) [18]. Celui-ci possède une structure similaire aux acides 4-penténoïque qui sont connus pour être hépatotoxiques [19,20]. L'AVP peut être aussi converti par la β -oxydation par une réaction de déshydrogénation en

acide 2-n-propyl-(E)-2-penténoïque (2-ène-AVP) puis en un ester de CoA mitochondrial l'acide 2-n-propyl-(E)-2,4-pentadiénoïque (2,4-diène AVP) (Figure 1.4). Par conséquent, ces esters CoA peuvent potentiellement affecter de nombreuses fonctions cellulaires comme la β -oxydation mitochondriale, et déclencher un déséquilibre de l'état énergétique de la cellule.

La présence de l'AVP induit aussi une diminution de la synthèse de la carnitine par un blocage de la butyrobétaine-3-hydroxylase, et donc un déficit en carnitine libre, ce qui inhibe le transport à travers la membrane mitochondriale des autres AG. Le métabolisme est alors dévié vers une ω ou une ω -1-oxydation à l'intérieur des microsomes, qui est à l'origine des dérivés dicarboxyliques hépatotoxiques [21,22]. Cette déviation peut entraîner des troubles mineurs qui peuvent s'aggraver en cas de maladie métabolique ou d'intoxication.

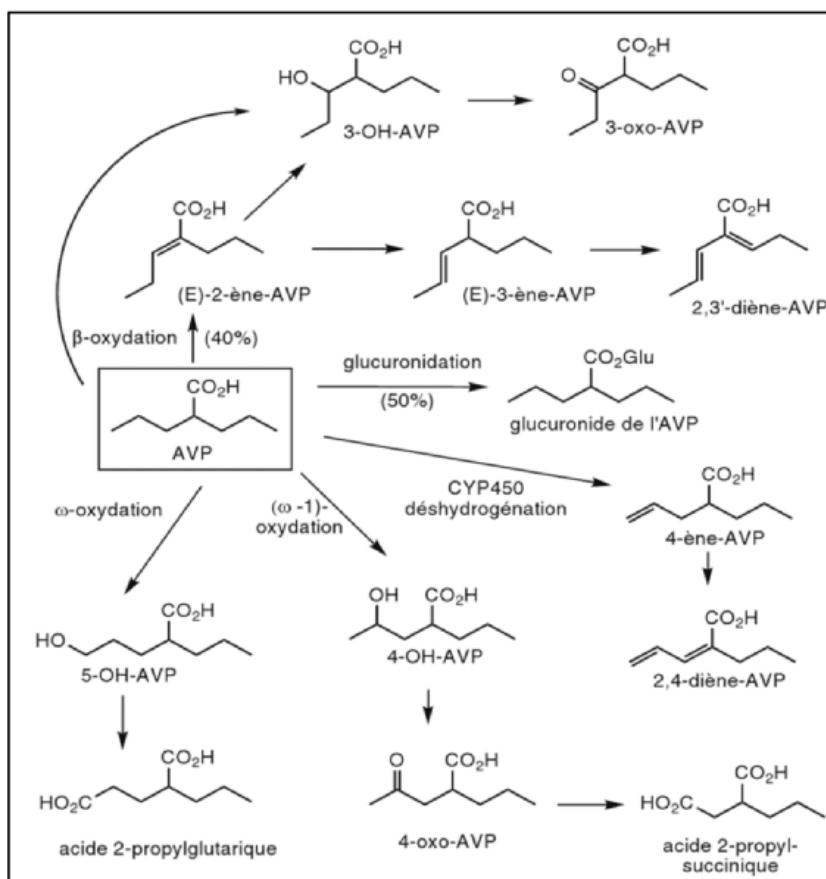


Figure 1.4: Principales voies de biotransformation de l'AVP.

[23]

Parmi les produits de dégradation de l'AVP on distingue donc :

- Les dérivés produits par la glucuronidation: glucuronide de l'AVP;
- Les dérivés produits par la β -oxydation: 2-ène-AVP, 3-OH-AVP, 3-céto-AVP, 3-ène-AVP;
- Les dérivés produits par l' ω -oxydation: 5-OH-AVP, APG, 4-ène-AVP;
- Les dérivés produits par l' ω -1-oxydation: 4-OH-AVP, 4-céto-AVP.
- Les dérivés produits par le métabolisme oxydatif catalysé par le CYP450 : 4-ène-AVP, 2-4-diène-AVP.

Il faut noter que le métabolisme oxydatif catalysé par le CYP450 joue un rôle mineur dans l'élimination de l'AVP, comparé à la glucuronidation et à la β -oxydation mitochondriale.

1.5 Élimination

La voie urinaire est la principale voie d'élimination de l'AVP dont 30 à 50% de la dose ingérée apparaît dans les urines sous forme glucurono-conjuguée, 40% est éliminé après métabolisation par la β -oxydation mitochondriale en dérivés liés à la carnitine (valproyl-carnitine) [24,25], et moins de 15% est éliminé par ω et (ω -1) hydroxylation microsomales et d'autres réactions d'oxydation. Moins de 3% de la dose ingérée est excrétée sous forme inchangée dans les urines. On peut trouver aussi des traces d'AVP excrété dans la bile, les fèces et l'air expiré [7].

1.6 Hépatotoxicité induite par l'acide valproïque

Depuis son introduction en clinique l'AVP est connu pour ses effets indésirables dont les plus courants sont des effets généraux comprennent des nausées, des vomissements et des brûlures d'estomac [26], et les principaux effets toxique sont la tératogénicité et l'hépatotoxicité.

D'un point de vue morphologique, l'hépatotoxicité de l'AVP se caractérisait par des lésions cholestatiques généralement accompagné avec des troubles biochimiques se manifesteraient par une élévation des taux d'aminotransférases et aussi de la bilirubine. Ces altérations hépatiques induites par l'AVP impliqueraient plusieurs métabolismes aboutiraient ultérieurement à diverses

conséquences néfastes telles le déficit énergétique, la stéatose microvésiculaire, une nécrose hépatocellulaire et la mort cellulaire [27,28].

Deux formes d'atteinte hépatique ont été décrites. Une toxicité directe dose-dépendante qui est fréquente, souvent asymptomatique, et peut disparaître après réduction des doses d'AVP [29], et une toxicité indirecte sévère indépendante de la dose impliquant l'idiosyncrasie métabolique et par la polythérapie parfois [13].

Selon la littérature l'incidence de l'atteinte hépatique liée à l'AVP est de 0,01% [6]. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer cette hépatotoxicité mais le mécanisme exact reste une source de débat [3]. Plusieurs études ont rapporté que l'AVP interfère avec plusieurs processus métaboliques dans les mitochondries hépatiques telles que la β -oxydation et la phosphorylation oxydative [7]. Ce qui contribue à la fois à l'hyperammoniémie et une acidose lactique. En plus, l'AVP bloque directement la carbamoyl-phosphate synthétase enzyme clé du cycle de l'urée [13].

A côté de l'inhibition du cycle de l'urée et de l'altération du métabolisme des acides aminés (baisse du N-acyl-glutamate) au niveau hépatique, l'AVP engendre une élévation de la production d'ammoniaque par le rein qui est liée à une modification de la perméabilité mitochondriale avec augmentation du transport de la glutamine et une stimulation de la glutaminase rénale [13].

En cas de stéatose il existe une dysfonction et des altérations structurelles des mitochondries, et légèrement lysosomale [30]. Les conséquences d'un tel dysfonctionnement sont d'une part une accumulation d'AG dans l'hépatocyte par altération de la capacité d'oxydation mitochondriale et d'autre part la surproduction d'ERO [7,30]. Les ERO produites par les mitochondries peuvent par exemple dans les hépatocytes favoriser la peroxydation des lipides qui génère des dérivés aldéhydiques toxiques tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéanal (4-HNE) [31]. La peroxydation peut causer la mort cellulaire (d'où la nécrose tissulaire), et entraîner le re-largage des dérivés aldéhydiques [7].

D'autres auteurs ont également rapporté que les ERO et ces dérivés aldéhydiques peuvent alors secondairement activer les cellules de Kupffer (macrophages résidents dans le foie) et les cellules étoilées qui participent respectivement à l'inflammation et à la fibrogenèse (stimulation de la production de collagène par les cellules de Ito d'où la fibrose) [31,32]. Les dysfonctions mitochondriales et/ou lysosomales et la production de cytokines telles que le TNF- α et le TGF- β peuvent également déclencher la mort de certains hépatocytes [33].

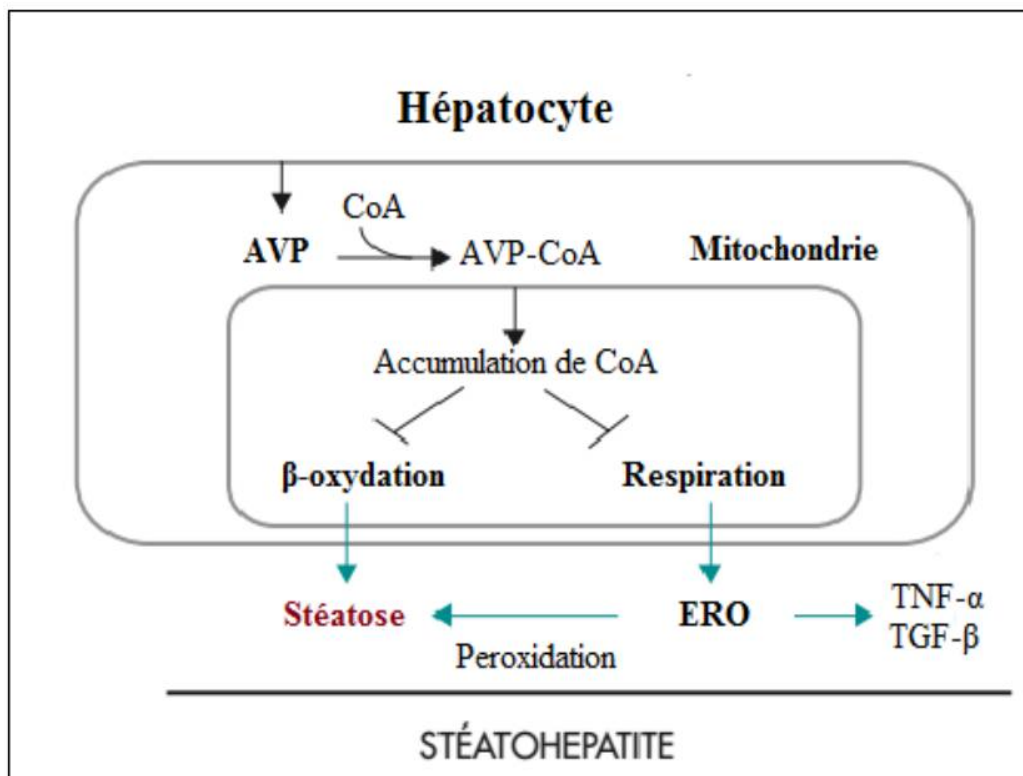


Figure 1.5: Mécanismes proposés de l'hépatotoxicité induite par l'AVP.
AVP: acide valproïque; AVP-CoA: valproyl-CoA; CoA; coenzyme A; ERO: espèces réactives de l'oxygène.

Références bibliographiques

- [1] Aktas A, Nergiz Y, Nergiz Y, et al. The effects of valproic acid on renal corpuscle of pregnant rats and protective role of folic acid and vitamin E. *Afr J Biotechnol.* 2010; 9:5605-5610.
- [2] Terbach N, Shah R, Kelemen R, et al. Identifying an uptake mechanism for the antiepileptic and bipolar disorder treatment valproic acid using the simple biomedical model *Dictyostelium*. *J Cell Sci.* 2011; 124:2267-2276.
- [3] Meunier H, Carraz G, Meunier Y, et al. Propriétés pharmacodynamiques de l'acide n-dipropyacétique. *Thérapie.* 1963; 18:435-438.
- [4] Neels HM, Sierens AC, Naelaerts K, et al. Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42:1228-1255.
- [5] Lempérière TH. Historique du développement du valproate dans les troubles bipolaires. *L'encéphale.* 2001; 27:365-372.
- [6] Bédry R, Parrot F. Intoxication grave par l'acide valproïque. *Réanimation.* 2004; 13:324-333.
- [7] Silva MF, Aires CC, Luis PB, et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inher Metab Dis.* 2008; 31:205-216.
- [8] Lheureux PE, Hantson P. Carnitine in the treatment of valproic acid-induced toxicity. *Clin Toxicol.* 2009; 47:101-111.
- [9] Frey HH, Loscher W. Distribution of valproate across the interface between blood and cerebrospinal fluid. *Neuropharmacology.* 1978; 17:637-642.
- [10] Loscher W. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamics properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol.* 1999; 58:31-59.
- [11] Davis R, Peters DH, Mc Tavish D. Valproic acid. A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs.* 1994; 47:332-372.
- [12] Hodges BM, Mazur JE. Intravenous valproate in status epilepticus. *Ann Pharmacother.* 2001; 35:1465-1470.
- [13] Ghozzi H, Hakim A, Sahnoun Z, et al. Relationship between plasma concentrations of valproic acid and hepatotoxicity in patients receiving high doses. *Rev Neurol.* 2011; 167:600-606.
- [14] Abbott FS, Anari MR. Chemistry and biotransformation. In: Löscher W, ed. *Milestones in Drug Therapy-Valproate*, Basel: Birkhäuser Verlag. 1999; 47-75.

- [15] Silva MF, Ruitern JP, Overmars H, et al. Complete β -oxydation of valproate: cleavage of 3-oxovalproyl-CoA by a mitochondrial 3-oxoacyl-CoA thiolase. *Biochem J.* 2002; 262:755-760.
- [16] Sadeque AJM, Fisher MB, Korzekwa KR, et al. Human CYP2C9, and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283:698-703.
- [17] Rettie AE, Rettenmeier AW, Howald WN, Baillie TA. Cytochrome P450-catalyzed formation of delta 4-VPA, a toxic metabolite of valproic acid. *Science.* 1987; 235:890-893.
- [18] Zimmerman HJ, Ishak KG. Valproate-induced hepatic injury: analysis of 23 fatal cases. *Hepatology.* 1982; 2:591-597.
- [19] Romet M, Abbott FS, Tang W, et al. Cyto-toxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins C and E in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicology.* 1996; 112:69-85.
- [20] Murakami K, Sugimoto T, Nishida N, et al. Abnormal metabolism of carnitine and valproate in a case of acute encephalopathy during chronic valproate therapy. *Brain Dev.* 1992; 14:178-181.
- [21] Sugimoto T, Muro H, Woo M, et al. Valproate metabolites in high-dose valproate plus phenytoin therapy. *Epilepsia.* 1996; 37:1200-1203.
- [22] Coulter DL. Carnitine, valproate, and toxicity. *J Child Neurol.* 1991; 6:7-14.
- [23] Katayama H, Mizukami K, Yasuda M, Hatae T. Effects of carnitine on valproic acid pharmacokinetics in rats. *J Pharm Sci.* 2016; 105:3199-3204.
- [24] Hiraoka A, Arato T, Tominaga I. Reduction in blood free carnitine levels in association with changes in sodium valproate (VPA) disposition in epileptic patients treated with VPA and other anti-epileptic drugs. *Biol Pharm Bull.* 1997; 20:91-93.
- [25] Begriche K, Massart J, Robin MA, et al. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J. Hepatol.* 2011; 54:773-794.
- [26] Ponchaut S, van Hoof F, Veitch K. In vitro effects of valproate and valproate metabolites in mitochondrial oxidation. Relevance of CoA sequestration to the observed inhibitions. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43:2435-2442.
- [27] Komulainen T, Lodge T, Hinttala R, et al. Sodium valproate induces mitochondrial respiration dysfunction in HepG2 in vitro cell model. *Toxicology.* 2015; 331:47-56.
- [28] Ponchaut S, Veitch K. Valproate and mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 1993; 46:199-204.

- [29] Neuman MG, Nanau RM, Shekh-Ahmad T, Yagen B, Bialer M. Valproic acid derivatives signal for apoptosis and repair in vitro. *Clin Biochem.* 2013; 46:1532-1537.
- [30] Pourahmad J, Eskandari MR, Kaghazi A, et al. A new approach on valproic acid induced hepatotoxicity: involvement of lysosomal membrane leakiness and cellular proteolysis. *Toxicol In Vitro.* 2012; 26:545-551.
- [31] Berson A, De Beco V, Lettéron P, et al. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology.* 1998; 114:764-774.
- [32] Mitchell C, Robin MA, Mayeuf A, et al. Protection against hepatocyte mitochondrial dysfunction delays fibrosis progression in mice. *Am J Pathol.* 2009; 175:1929-1937.
- [33] Labbe G, Pessayren D, Fromentyn B. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008; 22:335-353.

Chapitre 2

Mitochondrie et dysfonctionnement mitochondrial induit par l'AVP

2.1 La mitochondrie

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires qui ont été considérées comme une véritable centrale d'énergie produite sous forme d'ATP indispensable pour la cellule, elles jouent un rôle capital dans l'homéostasie cellulaire [1]. On considère en général que le nombre, la forme et le volume total des mitochondries très variables selon les tissus et, dans un même tissu, selon les conditions physiologiques et pathologiques elles sont proportionnelles au volume cellulaire et liées aussi à l'activité cellulaire: à titre d'exemple, environ 1500 mitochondries occupent 20% du volume d'un hépatocyte [2]. Les mitochondries sont considérées comme des organites dynamiques qui modifient leur distribution, leur structure et leur fonction selon les circonstances, telles la disponibilité d'oxygène ou le stress [3].

2.2 Structure mitochondriale

Au niveau ultra-structural, la mitochondrie est composée de six compartiments : la membrane interne, la membrane externe, la membrane des crêtes, l'espace intracrête, l'espace intermembranaire et la matrice [3].

La membrane externe

La membrane externe est une bicouche lipidique extrêmement perméable à diverses molécules [4]. Le passage transmembranaire des petites molécules, eau et ions hydrosolubles, est assuré par une des protéines monomères, les porines constituant des canaux VDAC (voltage-dependent anion channel) [4]. D'autres protéines sont insérées dans la membrane externe jouent des rôles bien spécifiques : l'acyl-CoA synthase catalyse la synthèse d'acyl-CoA, la carnitine palmitoyl transférase I (CPT I) qui transforme les radicaux acyles à longue chaîne en acylcarnitine capable de pénétrer dans les mitochondries [5] et le Cyt *b5* qui participe aux réactions de transfert d'électrons.

L'espace intermembranaire

C'est un espace étroit qui renferme certain nombre de protéines, tel le Cyt *c* localisé sur la face externe de la membrane mitochondriale interne à laquelle il reste faiblement lié [6,7]. Il contient également les caspases qui sont des protéases intracellulaires de la famille ICE (interleukine-1 converting enzyme) [8] et les AIF (apoptosis inducing factor). Dans cet espace ils se trouvent aussi des ions H^+ expulsés au niveau des complexes I, III et IV, qui sont à l'origine de sa charge positive [9].

La membrane interne

La membrane interne a une organisation très spécialisée, elle est constituée de 75% de protéines et 25% de lipides [10]. Bien que dépourvue du cholestérol, elle synthétise, un phospholipide unique, le diphosphatidyl-glycérol (cardiolipide) [11], qui contribue à rendre la membrane interne particulièrement imperméable aux protons et à la plupart des ions et des métabolites, permettant une forte séparation entre la matrice mitochondriale et l'environnement cytosolique [7]. En effet, la membrane interne n'est perméable qu'à l'oxygène, l'eau, le gaz carbonique, l'oxyde nitrique et l'ammoniac. Cette membrane dispose d'une grande surface de contact entre l'espace intermembranaire et la matrice par la formation de replis sur elle-même appelés les crêtes mitochondriales c'est au niveau de ces crêtes que est préférentiellement enchâssé le système de phosphorylation oxydative. Ce dernier est composé de cinq complexes protéiques et deux transporteurs solubles, le coenzyme Q (CoQ, encore appelé ubiquinone) faisant la navette entre les complexes I, II et

III et le Cyt *c*, lié à la cardiolipine assurant le transport des électrons entre les complexes III et IV [12,13].

— **Le complexe I (NADH déshydrogénase ou NADH ubiquinone oxydoréductase)**

C'est la première enzyme dans la chaîne de transport d'électrons. Il est le plus gros des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire avec une masse d'environ 980 kDa [5] et 47 sous-unités [14]. Le complexe I contient de la flavine mono nucléotide (FMN) [15], et des cofacteurs liés constitués d'atomes de fer et de soufre (centres Fer-Soufre) au nombre de 6. Ce complexe dépasse largement sur les deux faces de la membrane [16].

— **Le complexe II (succinate déshydrogénase ou succinate-CoQ réductase)**

Il présente la particularité d'être à la fois une enzyme du cycle de Krebs et un complexe de la chaîne respiratoire. Il est constituée de quatre peptides d'une masse d'environ 200 kDa [5] dont deux sous-unités hydrophobes (SdhC et SdhD) sont incluses dans la membrane interne de la mitochondrie et deux sous-unités hydrophiles étant seulement liées aux premières sur la face matricielle de la membrane, comprend une flavoprotéine (SdhA) contenant la FAD, 3 centres fer-soufre (SdhB) et un Cyt *b*560 [17].

— **Le complexe III (ubiquinol cytochrome *c* réductase)**

Le complexe III est un homodimère, chaque monomère est constitué de 11 sous-unités polypeptidiques et a une masse de 240 kDa. Il comprend deux Cyt *b*560, un Cyt *c*1 et deux centres fer-soufre [17]. Il est situé dans la membrane interne et dépasse largement sur les deux faces [5,18].

— **Le complexe IV (cytochrome *c*-oxydase)**

Le complexe IV est la dernière enzyme de la chaîne de transport d'électrons, il a une masse de 204 kDa [5,18] et il est composé de 13 sous-unités polypeptidiques [9,19]. Il contient deux groupements hèmes (Cyt *a* et Cyt *a*3) et deux ions cuivre [10, 18]. Il est situé dans la membrane interne et dépasse surtout sur la face intermembranaire [16].

— **Le complexe V (l'ATP-synthétase ou (F1–F0) ATPase)**

Le complexe V plus généralement dénommé ATP-synthase peut se définir comme un moteur moléculaire responsable de la synthèse d'ATP mitochondriale. C'est une grosse pro-

téine multimérique de 600 kDa [5] qui représente seul 15% de la masse des protéines de la membrane interne. Il est composé de deux domaines principaux F0 et F1. La tête sphérique (particule F1) qui est constituée de cinq types de chaînes polypeptidiques : α , β , γ , δ et ε . Les sous-unités α et β disposent selon un anneau hexagonal [20] baignant dans la matrice et accrochée par la tige centrale constituée des sous-unités γ et ε pour former une voie de passage aux protons [6].

— L'ubiquinone 50 (coenzyme Q10)

C'est un coenzyme transporteur d' H^+ avec une masse moléculaire de 863 Da qui présente la particularité d'être liposoluble [17].

D'autres protéines sont enchâssées dans la membrane interne jouent des rôles bien spécifiques, telles que la translocase des nucléotides adényliques (ANT) qui permet l'entrée de l'ADP dans la matrice et la sortie conjointe de l'ATP dans l'espace intermembranaire, les complexes TIM (translocase of the inner membrane) qui autorise le déplacement de nombreuses protéines et empêche la fuite d'ions à travers la membrane interne, le cotransporteur de phosphate inorganique/proton, le symporteur pyruvate/proton, la navette du glycérol-3-phosphate, la navette malate/aspartate permettent les échanges métaboliques, le transporteur du citrate et la CPT II [21,22]. Le complexe Oxa (assemblage de protéines membranaires multimériques) qui catalyse le transport protéique à travers la membrane mitochondriale interne [21,7]. Il sert d'intermédiaire de l'insertion de protéines de la membrane interne qui sont synthétisées à l'intérieur de la mitochondrie [21,23].

La chambre interne (la matrice)

La matrice mitochondriale est le siège de nombreuses voies métaboliques aussi bien cataboliques comme le cycle de Krebs et la β -oxydation des AG. Elle renferme également plusieurs copies circulaires de l'ADNmt ainsi que une grande quantité d'enzymes comme les enzymes d'oxydation et les enzymes de la réplication, de la transcription et de la traduction du matériel génétique mitochondriale [10] et des molécules de NADH et de NADPH qui interviennent dans le transport des électrons [4]. Elle héberge aussi des molécules d'ARN messenger et des ARN de transfert et quelques mitoribosomes qui ressemblent aux ribosomes bactériens.

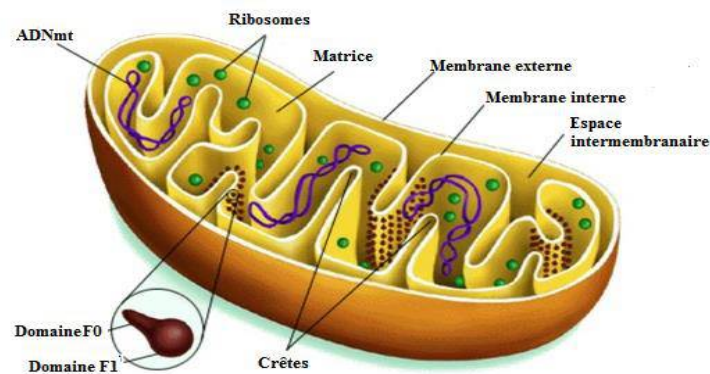


Figure 2.1: Représentation schématique de la structure mitochondriale.
(<http://delgadowassu.blogspot.com/2016/01/blog-de-biologia-celular.html>)

2.3 Les fonctions de la mitochondrie

2.3.1 La production d'énergie

La mitochondrie se définit avant tout comme la principale centrale énergétique de la cellule où se déroule une partie de l'oxydation des glucides, des acides aminés, et la totalité de celle des AG par ses trois systèmes principaux : la phosphorylation oxydative, la β -oxydation et le cycle de Krebs [24]. Les cycles d'oxydation de l'acide pyruvique et des AG produisent non seulement des métabolites intermédiaires mais également des cofacteurs réduits qui jouent un rôle fondamental dans la production de l'énergie. L'énergie intrinsèque de ces équivalents réduits est transformée en une forme d'énergie directement utilisable pour le travail cellulaire, l'ATP [5].

2.3.1.1 La chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative

La chaîne respiratoire comprend cinq complexes protéiques et deux transporteurs mobiles d'électrons (le CoQ 10 et Cyt *c*) qui passent d'un état réduit à un état oxydé grâce à un transfert d'électrons de complexe en complexe au travers des protéines ayant un potentiel d'oxydoréduction croissant [25]. Suite à la réduction successive des différents complexes et l'expulsion d'ions H^+ dans l'espace intermembranaire, un gradient de protons se forme et crée un potentiel électrochimique, ou force protomotrice, due à la différence de pH et de potentiel électrique ($\Delta\Psi_m$) à travers la membrane interne qui est imperméable aux protons [9]. L'énergie emmagasinée dans le gradient électrochimique de protons est utilisée pour assurer la phosphorylation de l'ADP en ATP

grâce à l'ATP-synthase [13]. Donc, la phosphorylation oxydative caractérise le couplage entre l'oxydation intervenant au niveau des complexes I à IV et la phosphorylation de l'ADP par le complexe V. La respiration (consommation d'oxygène) et la phosphorylation (production d'ATP) sont intimement couplées de telle sorte que la quantité d'ATP produite est proportionnelle à la quantité d'oxygène consommée (Figure 2.2).

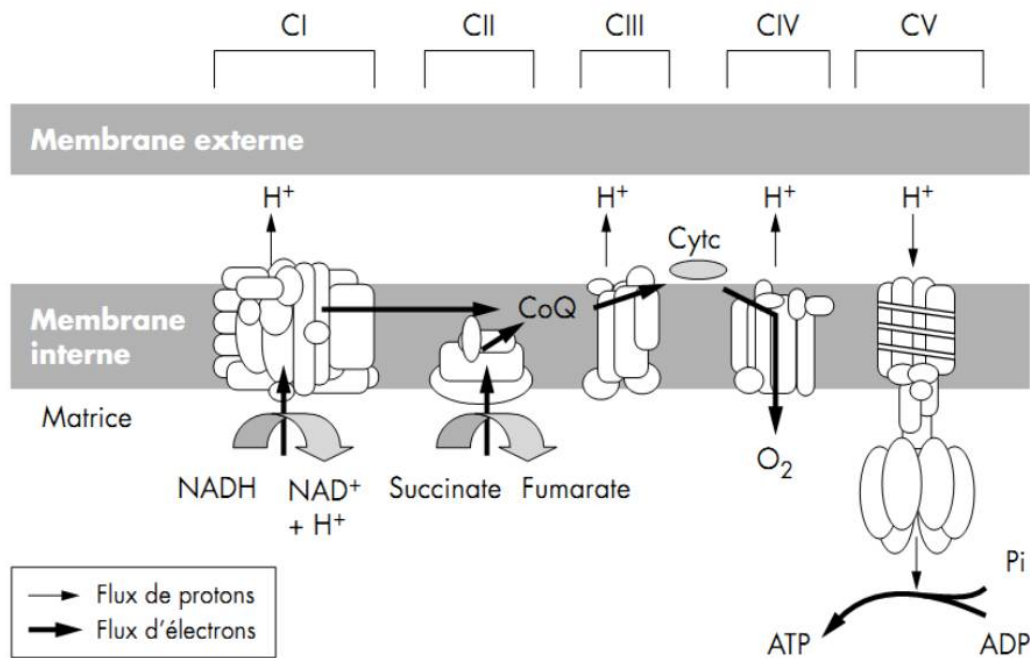


Figure 2.2: Le transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale. CI: Complexe I; CII: Complexe II; CIII: Complexe III; CIV: Complexe IV; CV: Complexe V; Cyt c: cytochrome c; CoQ: coenzyme Q. [1]

2.3.1.2 Oxydation des acides gras

L'oxydation des AG se fait principalement par la voie de la β -oxydation qui regroupe une succession de réactions enzymatiques :

- L'activation des AG en thioesters d'acyl-CoA catalysée par les acyl-CoA synthétase situées au niveau de la membrane externe mitochondriale puis en acyl-CoA après une hydrolyse par la pyrophosphatase.
- L'acyl-CoA est ensuite transformé en acylcarnitine, par la CPT I, capable de pénétrer la membrane mitochondriale interne. Ce transport est possible grâce à la présence de

la carnitine-acylcarnitine translocase qui se comporte comme un échangeur de carnitine [24]. En revanche les AG à courte chaîne ne nécessitent pas de transporteur et entrent directement dans la mitochondrie [26].

- Dans la matrice mitochondriale, l'acyl-CoA entre dans le cycle de la β -oxydation commençant par une réaction d'oxydation FAD dépendante, réalisée par une acyl-CoA déshydrogénase qui conduit à un trans- Δ^2 -énoyl-CoA. Les électrons sont immédiatement transmis à une flavoprotéine de transport d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le trans- Δ^2 -énoyl-CoA est hydraté par l'énoyl-CoA hydratase pour donner L- β -hydroxyacyl-CoA. Le groupe hydroxyle en C-3 de ce dernier est convertit en un groupe carbonyle par L- β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase dont NAD^+ est l'accepteur d'électrons avec formation de β -cétoacyl-CoA. Une dernière réaction de thiolyse, catalysée par l'acyl-CoA acétyltransférase et le clivage thiolytique du β -cétoacyl-CoA donne une molécule d'acétyl-CoA et un acyl-CoA raccourci de deux atomes de carbone éliminés en même temps de l'extrémité carboxylée de ce dernier [19,27]. Ce cycle se répète un nombre de fois correspondant au nombre de paires de carbones de l'AG, et dans le cas d'un AG à nombre impair de carbones, le résidu final possédant trois carbones, le propionyl-CoA, est transformé en succinyl-CoA qui est un intermédiaire du cycle de Krebs.

2.3.1.3 Le cycle de Krebs

Il est également appelé cycle de l'acide citrique ou cycle des acides tricarboxyliques, est une voie oxydative qui constitue un carrefour métabolique permettant l'oxydation des acétyl-CoA, provenant de la dégradation des oses, des AG et des acides aminés. Il se déroule dans la matrice mitochondriale des cellules eucaryotes et assure la plus grande part des besoins énergétique de la cellule grâce à la formation des coenzymes réduits qui seront réoxydés dans la chaîne respiratoire [26]. Les principaux résultats du cycle de Krebs sont la dégradation d'un acétyl-CoA correspond à la production de deux molécules d'ATP par molécule de glucose d'un ubiquinol et le transfert des électrons riches en énergie aux 3 NADH et FADH_2 , de 2 CO_2 permettant la formation de 12 ATP, en final [28].

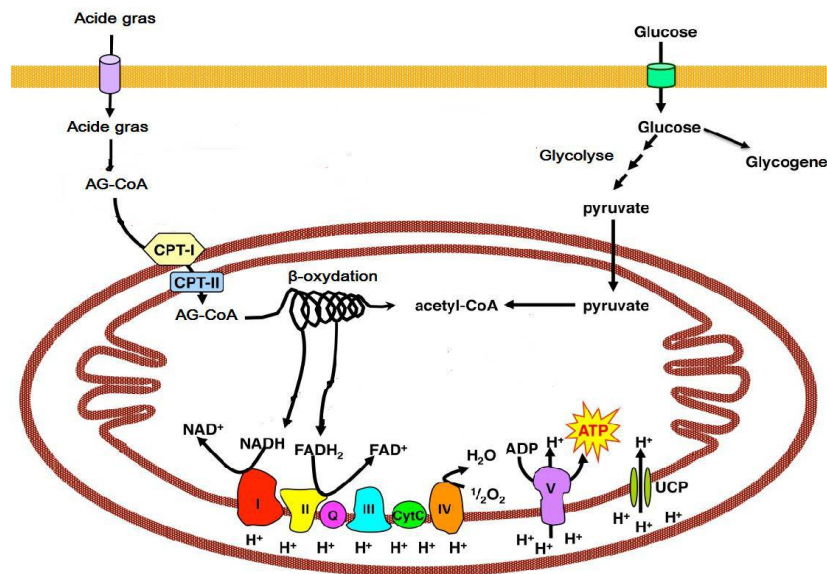


Figure 2.3: La production d'énergie via la β -oxydation et le cycle de Krebs.
 AG: acide gras; CPT-I: carnitine palmitoyl transferase I; CPT-II: carnitine palmitoyl transferase II. (<http://dx.doi.org/10.5772/56449>)

2.3.2 Mort/survie cellulaire

L'apoptose correspond à un processus physiologique normal [1] qui permet l'élimination des cellules endommagées ou indésirables pour l'organisme [29,11]. Il peut aussi signaler des situations physiopathologiques où les membranes mitochondriales perdent leur intégrité physique et fonctionnelle [30,10]. Ce processus biologique organisé d'autodestruction de la cellule est souvent déclenché par deux grandes voies de signalisation. La première est dite extrinsèque ou voie « des récepteurs de mort », elle est initiée à la surface de la cellule par la liaison des ligands spécifiques sur certains récepteurs membranaires [31,32]. La deuxième voie est appelée voie intrinsèque ou « mitochondriale » où la mitochondrie occupe une place centrale dans ce processus de mort cellulaire par apoptose.

La régulation de l'apoptose par les mitochondries fait intervenir des protéines de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma). Cette famille regroupe des protéines pro-apoptotiques comme (Bax, Bak, Bad, Bim, Bik, Bid) et anti-apoptotiques tels que (Bcl-2, Bcl-xl). L'insertion des protéines pro-apoptotiques dans la membrane mitochondriale peuvent conduire à l'ouverture des PTPm est la conséquence d'une part une rentrée massive de protons dans la matrice, effondrant le potentiel membranaire et le stock cellulaire d'ATP aboutissant à la perte du gradient électrochimique entre la membrane interne et la matrice. D'autre part elle provoque un gonflement mitochondrial et

la rupture de la membrane externe libérant dans le cytosol le Cyt *c*, les AIF et les protéines contenues dans l'espace intermembranaire. Ceci induit le recrutement de la pro-caspase-9 et la formation d'un complexe appelé apoptosome puis l'activation de la caspase-9 qui déclenche la partie effectrice des caspases, famille de cystéine protéases, responsables de l'hydrolyse de nombreuses protéines cellulaires et entraîne la mort de la cellule [24].

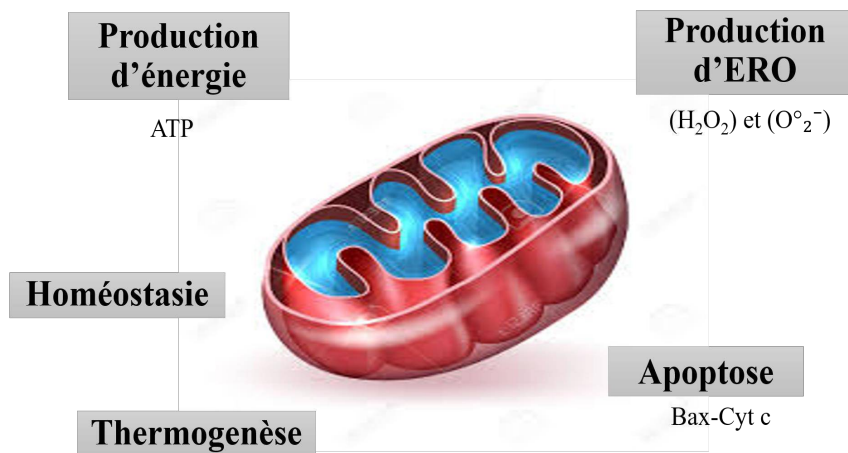


Figure 2.4: Les différentes fonctions de la mitochondrie.

2.3.3 Mitochondrie et stress oxydant

Les ERO sont produits naturellement dans l'organisme et se sont acteurs importants de la signalisation cellulaire et la régulation des métabolismes de différents processus physiologiques, bien qu'ils soient la plupart du temps responsables de dommages causés aux structures biologiques.

La mitochondrie est considérée comme une principale source de production des ERO et la chaîne respiratoire mitochondriale génère 90% des ERO cellulaires [33]. Comme nous l'avons vu précédemment, la chaîne respiratoire transfère les électrons de complexes en complexes et le dernier accepteur d'électrons est l'oxygène donnant ainsi du H₂O au niveau du complexe IV par une réaction contrôlée, une fuite d'électrons peut intervenir et réduire partiellement l'oxygène matriciel pour aboutir à la formation de l'anion superoxyde (O₂^{•-}). Selon des études réalisées sur des mitochondries isolées cette fuite des électrons est provenue de deux sites, dont l'un se situerait au niveau du complexe I et l'autre au niveau du complexe III (voir figure 2.5) [33]. D'autre part Liu et ses collaborateurs [34] ont permis de montrer qu'il y a un transfert électronique inversé du

complexe II vers le complexe I. Ce flux inverse d'électrons est dû au fait qu'en absence d'ADP (stade 4), les électrons dérivés du succinate peuvent remonter au complexe I et réduire le NAD^+ en NADH [34]. Les travaux de Seifert ses collaborateurs [35] ont montré que la β -oxydation des AG de chaînes longues est associée à une production accrue des ERO via un mécanisme incluant le complexe III. Le taux de production des ERO est déterminé principalement par le potentiel membranaire, le ratio entre NADH/NAD^+ , le ratio entre CoQH_2 et CoQ et la concentration d' O_2 local [36].

Le ($\text{O}_2^{\cdot-}$) peut être transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase à manganèse (Mn-SOD) dans la matrice ou par Cu,Zn-SOD dans l'espace intermembranaire et parfois il combine avec le monoxyde d'azote (NO°) pour donner le peroxyde d'azote (ONOO^-) [37,38]. Le (H_2O_2) n'est pas un radical libre mais il peut s'accumuler et entraîner un stress oxydant mitochondrial via la réaction de Fenton qui se produit en présence de cations métalliques comme le Fe^{2+} ou le Cu^+ [39] et qui donne naissance à ($^\circ\text{OH}$) qui est l'espèce radicalaire la plus délétère.

En dehors de la chaîne respiratoire, de nombreux autres sites mitochondriaux ont été décrits comme participant à la production des ERO, les plus importants étant les monoamines oxydases et le Cyt *b5* réductase au niveau de la membrane externe mitochondriale et l'aconitase dans la matrice [40].

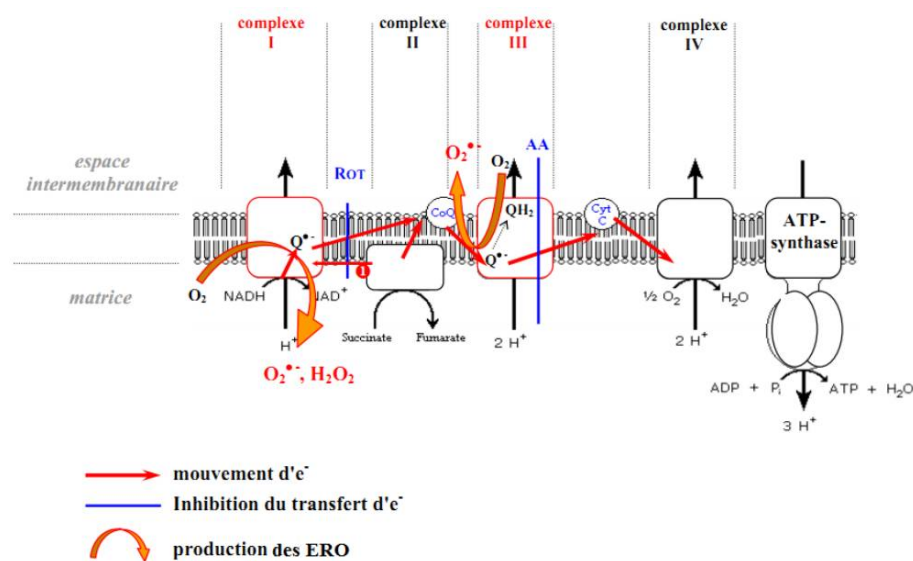


Figure 2.5: La production mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène.

[42]

La production des ERO par la chaîne respiratoire peut cependant augmenter de façon importante dans certaines situations, comme par exemple en cas d'inhibition de la circulation des électrons au sein de la chaîne respiratoire [41] ou lorsque les systèmes antioxydants sont déplétés. À long terme, cette surproduction des ERO peut déborder les systèmes antioxydants mitochondriaux et surtout les protéines mitochondriales qui sont extrêmement sensibles aux dommages induits par les ERO provoquant un découplage de la chaîne respiratoire. Les ERO peuvent entraîner l'oxydation du glutathion, la peroxydation des AG de la membrane interne de la mitochondrie mais également avoir des effets délétères sur les pompes ioniques, aggravant ainsi l'inhibition de la chaîne respiratoire. De même le stress oxydant se traduit aussi par des mutations de l'ADN, notamment de l'ADNmt qui est à l'origine de situations pathologiques [42].

Dans des conditions physiologiques, ces ERO sont éliminées en grande partie grâce à différentes enzymes antioxydantes présentes dans les mitochondries, telles que :

- La Mn-SOD qui convertit le radical ($O_2^{\circ-}$) en H_2O_2 [42].
- La catalase (CAT) qui catalyse la conversion du (H_2O_2) en (H_2O).
- Le glutathion peroxydase (GPx) et le glutathion réductase (GR), le GPx agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du (H_2O_2) en (H_2O) et (O_2) et le GR a pour rôle de régénérer le glutathion réduit (GSH) à partir du glutathion disulfide (GSSG) grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons.
- Les peroxyredoxine (Prx) ou thioredoxine peroxydase qu'elles exercent son rôle antioxydant à travers une activité peroxydase de (H_2O_2), de ($ONOO^-$) et de nombreuses hydroperoxydases. Elles représentent des substrats en faible efficacité catalytique par rapport au GPx et à la CAT [43].
- Les ubiquinones et le Cyt *c* : les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouent un rôle fondamental dans la production des ERO. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agit comme antioxydant. L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation des radicaux peroxylys. Il est également impliqué dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ERO [44].

Le Cyt *c* présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre de ($O_2^{\circ-}$) produit au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire. Par la suite le Cyt *c* réduit est oxydé par le complexe IV entraînant la formation de (H_2O) à partir d' O_2 [45].

2.4 Dysfonctionnement mitochondrial induit par l'AVP

De nombreux travaux ont montré l'apparition d'une hépatotoxicité chez les patients et chez les animaux traités par l'AVP [46]. L'hépatotoxicité par l'AVP se manifesterait principalement via le dysfonctionnement mitochondrial en agissant sur plusieurs voies métaboliques dont la plus connue est l'inhibition de la β -oxydation des AG [47]. Cette réduction sévère de l'oxydation des AG peut avoir plusieurs conséquences au niveau biochimique [48]:

- Une diminution de la synthèse d'ATP induite par l'altération de la phosphorylation oxydative qui peut aboutir à la sortie du Cyt *c*, activant alors le processus d'apoptose et la survenue d'une nécrose concomitante.
- Une diminution de la production des corps cétoniques (acétoacétate et β -hydroxybutyrate).
- une accumulation dans le plasma et les urines de dérivés d'AG (par exemple, acylcarnitine et acylglycine).
- Une réduction de la gluconéogenèse qui peut expliquer l'hypoglycémie sévère survenant chez certains individus.

2.4.1 Dysfonctionnement mitochondrial induit par l'AVP et stéatose hépatique

La stéatose hépatique est définie par un excès de lipides dans les hépatocytes, supérieur à 5% du poids du foie. Les lipides le plus souvent concernés sont les triglycérides. Généralement la stéatose est consécutive à un apport excessif de graisses et/ou à un défaut de leur élimination par la β -oxydation mitochondriale [48].

A concentration intracellulaire élevée, l'AVP bloque la butyrobétaine-3-hydroxylase, enzyme responsable de la synthèse de L-carnitine et forme des esters avec la L-carnitine entraînant une

diminution des concentrations intracellulaires de ce cofacteur qui est nécessaire au transport des AG à travers la membrane mitochondriale et donc à leur β -oxydation [48].

L'AVP peut générer aussi des métabolites par l'intermédiaire du CYP450 : 1) le dérivé AVP-CoA qui inhibe la CPT1 et diminue les stocks intra-mitochondriaux d'acyl-CoA, qui est un cofacteur indispensable à l'oxydation des AG endogènes. 2) le 4-ène-AVP qui pénètre dans la mitochondrie et génère du 2,4-diène-AVP-CoA, un métabolite réactif qui inactive des enzymes impliquées dans la β -oxydation comme l'acyl-CoA-deshydrogénase (Figure 2.6) [48].

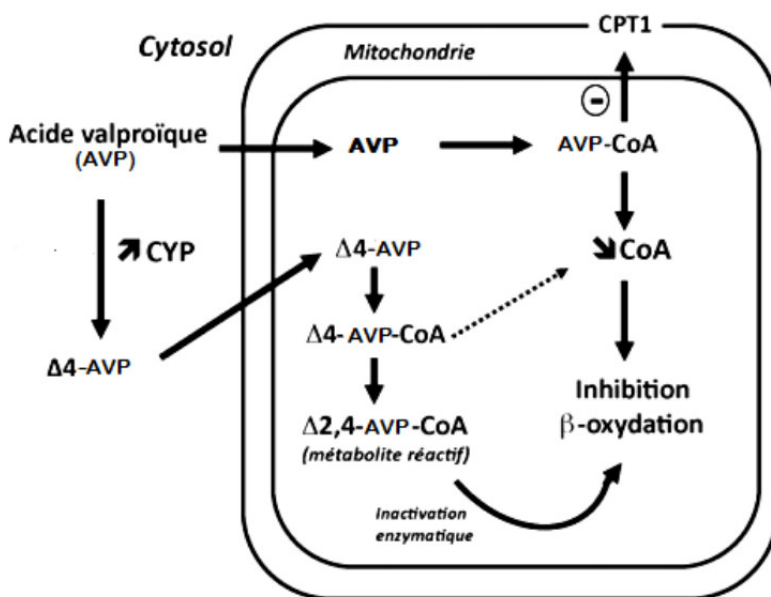


Figure 2.6: Mécanismes d'inhibition de la β -oxydation mitochondriale des AG par l'AVP.

CYP: cytochrome P450; Δ 4-AVP: acide 2-propyl-pentanoïque; Δ 2,4-AVP: acide 2-n-propyl-(E)-2,4-pentanoïque; CPT1: carnitine palmitoyl tranferase 1; CoA: coenzyme A [48].

La séquestration intramitochondriale du CoA inhibe l'activation et la β -oxydation des AG. Lorsque la β -oxydation est inhibée, les AG s'accumulent dans le cytosol sous forme libre ou estérifier en triglycérides émulsifiés provoquant une stéatose typiquement microvésiculaire (Figure 2.7) [49].

Des études ont été réalisées par Zimmerman et Ishak [50] rapportent des cas d'insuffisance hépatique fulminante chez les patients traités avec l'AVP caractérisées par une stéatose microvésiculaire idiosyncrasique, qui se développe dans les premières semaines du mois de traitement.

A partir de cas de surdosage entraînant une hépatotoxicité, des analyses microscopiques réalisées sur des coupes de parenchyme ont permis de mettre en évidence des signes de nécrose hépatique. L'essentiel de cette nécrose localisée au centrolobulaire est authentifiée par une dégénérescence hépatocytaire et une picnose nucléaire [50]. Par ailleurs, un infiltrat leucocytaire essentiellement à polynucléaires a été signalé. Les auteurs concluent à une nécrose fulminante hépatique touchant principalement les hépatocytes centrolobulaires [51].

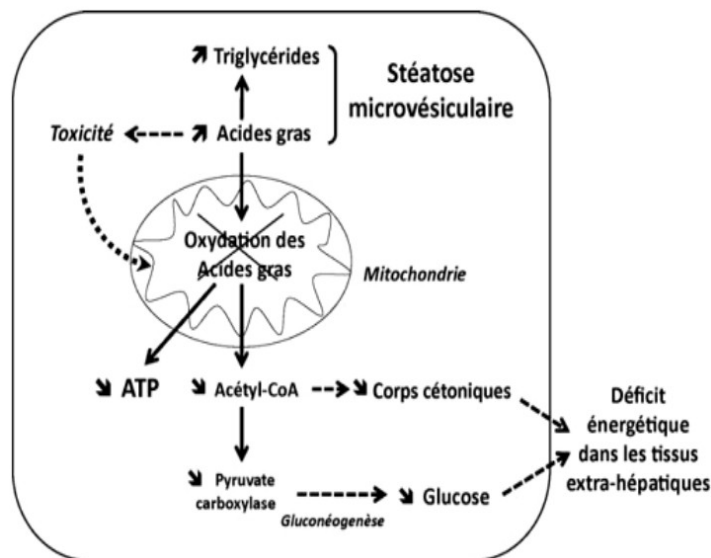


Figure 2.7: Conséquences métaboliques d'une inhibition sévère de la β -oxydation mitochondriale des acides gras.

[48]

Les anomalies de la β -oxydation provoquent un déficit énergétique de la cellule, car l'oxydation des AG est inhibée et l'accumulation d'AG non estérifiés avec leurs dérivés dicarbonates peut limiter l'exploitation du glucose et donc interrompre la phosphorylation oxydative. Les signes cliniques observés sont principalement une acidose lactique, une hyperammoniémie, une hypoglycémie et une augmentation nette des transaminases [51,46].

L'AVP peut également inhiber le cycle de l'urée qui est presque exclusivement hépatique. Il bloque une des étapes de ce métabolisme au niveau de la carbamyl phosphate synthétase ce qui entraîne une élévation de l'ammoniémie. Cette hyperammoniémie induite par l'AVP altère la respiration cellulaire car l'excès d'ammoniaque agit sur l' α -cétoglutarate en provoquant un épuisement de ses réserves [48].

2.4.2 Dysfonctionnement mitochondrial induit par l'AVP et stress oxydant

Bien que les mécanismes impliqués dans l'aggravation de la stéatose en stéatohépatite ne soient pas tous encore bien élucidés, il semble cependant que les dysfonctionnements mitochondriaux jouent un rôle important, en particulier l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale [47]. Dans les cas d'intoxication par l'AVP cette inhibition est en effet à l'origine d'une surproduction des ERO, qui constitue à son tour un facteur de risque important pour les lésions cellulaires et la dysfonction des mitochondries [52].

L'AVP peut induire un stress oxydant par de multiples mécanismes [52]. Plusieurs études ont rapporté que la toxicité de l'AVP est associée à une génération accrue des ERO qui amplifient les lésions cellulaires via l'oxydation et l'altération des protéines impliquées dans l'ouverture des PTPm [47,48] provoquant le gonflement massif des mitochondries et l'effondrement du potentiel de membrane et de la synthèse d'ATP permettant la libération d'agents apoptotiques (le Cyt *c*) [48]. Ces transitions de perméabilité mitochondriale traduisent aussi une augmentation brutale de la perméabilité de la membrane interne aux ions et molécules de petit poids moléculaire. Les éléments déclencheurs peuvent être des oxydants comme les peroxydes ou la présence d'ions calcium. Il en résulte une majoration des taux de peroxydes ainsi que d'importantes altérations de l'homéostasie calcique au sein de la cellule et un stress oxydatif intense occasionne et promeut ces transitions de perméabilité mitochondriale qui vont à leurs tours engendrer un stress oxydant, favorisant l'auto-entretien des dysfonctionnements des systèmes antioxydants débordés [53].

En outre, il a été montré aussi que l'AVP augmente le niveau du superoxyde mitochondrial et réduit l'expression protéique de la Mn-SOD responsable de l'élimination de ce dernier ce qui suggère un nouveau mécanisme pathologique lié à la toxicité de l'AVP mais le mécanisme exacte de la diminution des taux de Mn-SOD reste encore n'est pas claire [52].

Le glutathion réduit (GSH), tri-peptide composé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine, constitue un pilier de la défense anti-oxydante de la cellule. Il intervient dans la détoxification des métabolites des xénobiotiques comme l'AVP [47]. Le foie est la principale source de glutathion dans l'organisme, d'où une étroite corrélation entre les taux hépatiques et les taux plasmatiques. Les patients dont les réserves sont amoindries est une population particulièrement à risque d'hépatotoxicité [54]. Les conséquences pathologiques de la variation des taux de GSH

cellulaire s'expliquent par son rôle central dans l'homéostasie antioxydante [55]. En parallèle, le GSH est un garant du maintien de l'homéostasie de l'oxydoréduction. Les cellules, en particulier leurs mitochondries, sont constamment exposées au stress oxydatif. La réduction du H_2O_2 par le GSH est catalysée par le GPx. Le GSSG qui en résulte est à son tour réduit en GSH par le GR en présence de NADPH. Si l'oxydoréduction est débordée par la formation de GSSG, ce dernier est exporté directement hors de la cellule. La déplétion en GSH déséquilibre la balance oxydative et semble avoir un rôle décisif dans l'orientation de la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose [56].

L'hépatotoxicité de l'AVP est attribuée à ses métabolites détoxifiés par le GSH. Une concentration plus élevée de ces métabolites 4-ene-AVP et 2,4-diène-AVP conduit à l'épuisement du GSH. Suite à cette déplétion en GSH, les taux intracellulaires de peroxydes s'élèvent, provoquant un stress oxydant via une réaction de Fenton [57]. Ainsi, un mécanisme majeur d'une peroxydation lipidique induit par l'AVP a été démontré dans des cultures d'hépatocytes de rat. Celle-ci entretient les anomalies de la chaîne respiratoire [54]. Une des conséquences de ces altérations mitochondriales est l'activation des caspases (caspase 3) qui va cliver les substrats intracellulaires comme la cytokératine 18 (CK18) et induire l'apoptose des hépatocytes [51]. Il a été suggéré que ce dysfonctionnement mitochondrial était impliqué dans le développement des lésions d'une stéatohépatite [58].

Les produits de la peroxydation lipidique favorisent aussi la fibrogènes. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont clairement montré que les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique (MDA et 4-HNE) sont des médiateurs pro-inflammatoires importants, capables d'activer les cellules étoilées du foie et d'augmenter la synthèse de collagène de type 1, retrouvé majoritairement dans le tissu fibreux hépatique [59].

D'autres mécanismes mineurs ont été évoqués tel que l'augmentation du stress nitrosant qui induit des signaux cellulaires interagissant avec les protéines de l'apoptose et les endonucléases, et aboutissant aux transitions de perméabilité mitochondriale. Ces transitions de perméabilité provoquent une diminution de la synthèse d'ATP, ainsi qu'un auto-entretien de la production de stress oxydant et nitrosant [53].

Références bibliographiques

- [1] Chaussenot A, Rötig A, Paquis-Flucklinger V. Progrès dans les pathologies mitochondriales. 2011; 5669:69-89.
- [2] West AP, Shade GS. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11:389-402.
- [4] Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25:319-324.
- [4] Logan DC. The mitochondrial compartment. *J Exper Bot.* 2006; 57:1225-1243.
- [5] Jourdain A, Martinou JC. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41:1884-1889.
- [6] Kulawiak B, Höpker J, Gebert M, et al. The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 15:2-9.
- [7] Falkenberg M, Larsson NG. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *An Rev Biochem.* 2007; 76:679-699.
- [8] Dimmer KS, Papic D, Schumann B, et al. A crucial role of Mim2 in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *J Cell Sci.* 2012; 125:3464-3473.
- [9] Chautan M, Chazal G, Cecconi F, et al. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol.* 1999; 9:967-970.
- [10] Nevière R. Physiopathologie mitochondriale et syndrome septique. *Réanimation.* 2008; 17:185-191.
- [11] Wallace DC, Lott MT, Procaccio V. Mitochondrial genes in degenerative diseases, cancer and aging: Emery and Rimoin's Principle and Practice of Medical Genetics. Elsevier Ed. Chap. 2007; 13:194-298.
- [12] Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspases family proteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274:20049-20052.
- [13] Bereiter-Hahn J, Jendrach M. Mitochondrial dynamics. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2010; 284:1-65.
- [14] Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *J Exp Med.* 1998; 187:1261-1271.

- [15] Carla MK. Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett.* 2000; 476:27-31.
- [16] Gebert N, Ryan MT, Pfanner N, et al. Mitochondrial protein import machineries and lipids: A functional connection. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808:1002-1011.
- [17] Li Y. The presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria: Pam16 functions in an antagonistic manner to Pam18. *J Biol Chem.* 2004; 279:38047-38054.
- [18] Yamano K. The phosphate carrier has an ability to be sorted to either the TIM22 pathway or the TIM23 pathway for its import into yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 2005; 280:10011-10017.
- [19] Benard G, Rossignol R. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10:1313-1342.
- [20] Serratrice J, Desnuelle C. Quand penser à une maladie mitochondriale. *EMC Méd.* 2004; 1:262-275.
- [21] Callen JC. *Biologie cellulaire des molécules aux organismes.* 2e édition. Paris: Dunod; 2005:292-299.
- [22] Stroud DA, Oeljeklaus S, Wiese S, et al. Biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins: the POTRA domain is involved in precursor release from the SAM complex. *Mol Biol Cell.* 2011; 22:2823-2833.
- [23] Vallette FM. Modifications de la perméabilité membranaire mitochondriale au cours de l'apoptose : ouverture ou rupture. *Med Sci.* 2000; 16:261-264.
- [24] Grütter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Cur Opin Struct Biol.* 2000; 10:649-655.
- [25] Larrey D. Pathologies hépatiques mitochondriales. *Gastroenterol Clin Biol.* 2001; 25: 117-122.
- [26] Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol.* 2004; 55:706-712.
- [27] Weinman S, Méhul P. *Toute la Biochimie.* Paris: Dunop; 2004:159-256.
- [28] Berson A. Hépatotoxicité médicamenteuse par atteinte mitochondriale. *Hépatogastro* 2005; 12:191-198.
- [29] Albert B, Bray D, Lewis G, et al. *Biologie moléculaire de la cellule.* Paris : Flammarion medicine sciences; 1988: 529.

- [30] Jakobs S. High resolution imaging of live mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1763:561-575.
- [31] Lonlay P, Rötig A, Saudubray JM, et al. Présentations cliniques des cytopathies mitochondriales: corrélations phénotype-génotype. *Journées parisiennes de pédiatrie*. Flammarion medicine sciences. 2000; 113-122.
- [32] Odièvre MH, Lombès A, Odièvre M. Cytopathies mitochondriales secondaires chez l'enfant : concept récent, concept d'avenir. *Archives de pédiatrie*. 2003; 10:497-498.
- [33] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005; 120:483-495.
- [34] Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*. 2002; 80:780-787.
- [35] Seifert EL, Estey C, Xuan JY, Harper ME. Electron transport chain-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial H₂O₂ emission during long-chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem*. 2010; 285:5748-5758.
- [36] Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 1997; 416:15-18.
- [37] Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol*. 2006; 91:807-819.
- [38] Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47:333-343.
- [39] Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res*. 1996; 145:523-531.
- [40] Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry*. 2005; 70:200-214.
- [41] Rötig A, Cormier V, Blanche S, et al. Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin Invest*. 1990; 86:1601-1608.
- [42] Caroline S, Jean G. La chaîne respiratoire et sa génétique. *Maladies mitochondriales*. 2000; 2:227-234.
- [43] Kim HS, Kang SW, Rhee SG, Clerch LB. Rate lung peroxyredoxins I and II are differentially regulated during development and by hyperoxia. *Am J Physiol*. 2001; 280:1212-1217.

- [44] Packer MA, Scarlett JL, Martin SW, Murphy MP. Induction of the mitochondrial permeability transition by peroxynitrite. *Biochem Soc Trans.* 1997; 25:909-914.
- [45] Skulachev VP. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 1998; 423:275-280.
- [46] Bédry R, Parrot F. Intoxication grave par l'acide valproïque. *Réanimation.* 2004; 13:324-333.
- [47] Silva MF, Aires CC, Luis PB, et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inherit Metab Dis.* 2008; 31:205-216.
- [48] Fromenty B. Toxicité mitochondriale et métabolique des médicaments : mécanismes et conséquences au niveau du foie. *Réanimation.* 2010; 19:552-567.
- [49] Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial β -oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther.* 1995; 67:101-154.
- [50] Zimmerman HJ, Ishak KG. Valproate-induced hepatic injury: analysis of 23 fatal cases. *Hepatology.* 1982; 2:591-597.
- [51] Zimmerman HJ, Ishak KG. Antiepileptic Drugs. In: Cameron RG, Feuer G, de la Iglesia FA, eds. *Drug-induced hepatotoxicity.* Berlin: Springer-Verlag, 1996; 637-662.
- [52] Komulainen T, Lodge T, Hinttala R, et al. Sodium valproate induces mitochondrial respiration dysfunction in HepG2 in vitro cell model. *Toxicology.* 2015; 331:47-56.
- [53] Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol.* 2010; 196:369-405.
- [54] Lauterburg BH. Analgesics and glutathione. *Am J Ther.* 2002; 9:225-233.
- [55] De Leve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther.* 1991; 52:287-305.
- [56] Hall AG. Glutathione and the regulation of cell death. *Adv Exp Med Biol.* 1999; 457:199-203.
- [57] Zhang B, Wang X, Nazarali AJ. Ascorbic acid reverses valproic acid-induced inhibition of *Hoxa2* and maintains glutathione homeostasis in mouse embryos in culture. *Cell Mol Neurobiol.* 2010; 30:137-148.
- [58] Romet M, Abbott FS, Tang W, et al. Cyto-toxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins C and E in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicology.* 1996; 112:69-85.

[59] Nouette-Gaulain K, Quinart A, Letellier T, Sztark F. La mitochondrie : rôles et implications en anesthésie-réanimation. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2007; 26:319-333.

Chapitre 3

Lysosome et dysfonctionnement lysosomal induit par l'AVP

3.1 Les lysosomes

Les lysosomes sont des organites cellulaires hétérogènes de 0.2 à 0.5 μm , dont ils proviennent du réticulum endoplasmique (RE) via l'appareil de Golgi et renferment une grande variété d'enzymes hydrolytiques impliquées dans le catabolisme des macromolécules complexes (glycolipides, glycoprotéines, mucopolysaccharides, mucolipides, etc...) constituant un système cytoplasmique complexe servant à la digestion contrôlée d'une grande variété de matériaux d'origine exogène (hétérophagie) et endogène (autophagie) [1].

La structure des lysosomes est polymorphe, ils sont regroupés en deux ensembles du fait qu'ils peuvent être isolés ou liés à d'autres formations avec lesquels ils collaborent: les lysosomes primaires ou purs contenant que des enzymes lytiques (les hydrolases acides) qui sont donc impliqués dans tous les phénomènes de phagocytose, pinocytose, endocytose [2], et les lysosomes secondaires qui ont un contenu dans lequel on reconnaît diverses structures en cours de digestion et dont l'évolution ultime constitue les corps résiduels (ou corps d'inclusions) [3].

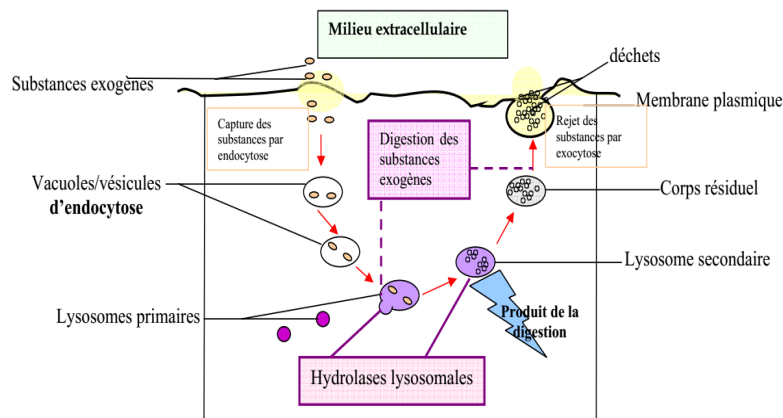


Figure 3.1: Lysosomes primaires et secondaires.

3.2 Types des lysosomes

Les phagocytosomes

Ils résultent de l'association d'un lysosome primaire avec une vacuole phagocytaire. Une fois que la vacuole phagocytaire est constituée, un ou plusieurs lysosomes viennent à son contact et y déversent leur contenu par fusion des membranes, ce qui permet aux hydrolases lysosomiques d'attaquer la particule et de la digérer dans une membrane imperméable protégeant le reste du cytoplasme [4].

Les corpuscules résiduels

Ils proviennent des phagocytosomes et renferment les résidus non digestibles des corps étrangers, notamment sels de fer ou sels de calcium.

Les cytolysosomes ou vacuoles autophagiques

Ils se constituent de la cellule ayant subi, au niveau d'un territoire limité de leur cytoplasme, un processus dégénératif localisé, physiologique ou pathologique. La zone lésée s'entoure d'une membrane qui constitue ainsi une vacuole dans laquelle vient se déverser les hydrolases lysosomiques [5].

3.3 Composition chimique

Les lysosomes sont entourés d'une bicouche phospholipidique de 75 Å d'épaisseur [6] qui contient des protéines de transport de composition spécifique comprenant des glycoprotéines fortement glycosylées qui la protègent des hydrolases: les protéines membranaires lysosomales pour « Lysosomal membrane proteins» (LMPs). Une cinquantaine de ces protéines lysosomales ont été décrites, chacune présentant une activité spécifique. Chez les mammifères, les lysosomes contiennent environ vingt-cinq LMPs [7]. Elles présentent diverses fonctions comme l'acidification de la lumière lysosomale, l'importation des protéines du cytosol, la fusion membranaire et le transport des produits de dégradation jusqu'au cytoplasme. Les LMPs les plus abondantes sont les protéines LIMP (Lysosomal- integral membrane protein) et LAMP (Lysosomal-associated membrane protein) dont les LAMP1 et LAMP2 qui sont impliqués dans le processus de maturation du phagosome [8].

3.3.1 Les enzymes hydrolytiques

On connaît une quarantaine d'enzymes hydrolytiques : des protéases (lysent les protéines), des nucléases (lysent les acides nucléiques : ribonucléase et désoxyribonucléase), des glycosidases (lysent les sucres), des lipases (lysent les lipides), des phospholipases, des phosphatases et des sulfatases. Ce sont toutes des hydrolases du type acide dont l'activité est optimale à un pH acide, ce milieu acide est maintenu par une pompe à protons ATPase à partir du cytoplasme dans la lumière lysosomale [9]. Le pH acide qui caractérise le compartiment lysosomal, assure les conditions optimales pour l'activité catalytique des enzymes et facilite partiellement la dénaturation des glycoprotéines. Ces enzymes susceptibles d'attaquer divers composés biologiques, particulièrement ceux à haut poids moléculaire mais ne sont en général pas actives se sont sous forme latente (ce qui protège la cellule en cas de fuite) [10].

3.3.2 Les cathepsines

Les cathepsines sont des enzymes appartenant à la famille des chymotrypsines, agissant de manière concertée sur les glycoprotéines pour conduire à la libération d'acides aminés et de dipeptides [11].

On distingue deux classifications pour ces protéases :

- **Nomenclature « EC »** : cette classification est réalisée par la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire et basée sur la réaction chimique qu'elle catalyse et le substrat impliqué dans la réaction. Selon la nature des sites de clivage et leur mécanisme catalytique on distingue les endopeptidases et les exopeptidases [11].
- Classification en clans et familles : cette classification répertorie les enzymes en fonction de la nature de l'acide aminé du site actif impliqué dans l'activité catalytique de ces enzymes. Il existe les cathepsines à sérine (A et G), les cathepsines à cystéine (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, et X) et les cathepsines aspartique (D et E) [12]. Elles sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, pré-pro-enzymes, qui sont transportés aux lysosomes ou leur activité optimale en raison de l'acidité du milieu [13].

Les cathepsines exercent également une activité dans l'environnement péricellulaire vers lequel elles sont sécrétées. Elles interviennent dans un grand nombre de fonctions physiologiques, comme la dégradation des protéines intracellulaires ou encore le recyclage des protéines au sein des compartiments endosomaux et lysosomaux. Elles participent ainsi à divers fonctions spécifique telles que la présentation de l'antigène aux CMH (cathepsines B, L et S), remodelage des tissus osseux (cathepsines K), la différenciation des kératinocytes (cathepsines L), l'apoptose (cathepsines C et B) ainsi qu'à divers processus pathologique [14,15].

3.3.3 Les hexosaminidase

Les hexosaminidases sont des glycosides hydrolases capables d'hydrolyser la liaison osidique des résidus de N-acétyl-D-hexosamine non réducteurs terminaux des N-acétyl- β -D-hexosaminides, ce qui permet la dégradation progressive de ces derniers [16]. Ces enzymes sont importantes dans le catabolisme lysosomal des glycosaminoglycanes et des glycosphingolipides qui sont des composés essentiels de la membrane plasmique des cellules eucaryotes [17].

Plusieurs pathologies pourraient se manifester par des changements d'état des lysosomes, se traduit par une perturbation de la stabilité des membranes lysosomales, cette dernière est utilisée dans le suivi de l'état de santé. La phosphatase acide (ACP), la β -galactosidase (β -GAL), la

β -N-acetylglucosaminidase (β -NAG) et la β -glucuronidase (β -GLU) sont considérées comme des principaux marqueurs lysosomals hépatiques [17].

3.4 Rôles des lysosomes

Les lysosomes sont des vésicules qui proviennent du RE via l'appareil de Golgi, représentant le compartiment terminal de la voie endocyttaire où se produit la dégradation de différentes macromolécules provenant par endocytose, phagocytose, ou autophagie (voir figure 3.2). La digestion des organites cellulaires s'effectue dans des autophagosomes. Des portions de la membrane peuvent être endocytées et recyclées à nouveau dans la membrane cellulaire (par ex. recyclage des récepteurs par endocytose par l'intermédiaire de récepteurs) [3].

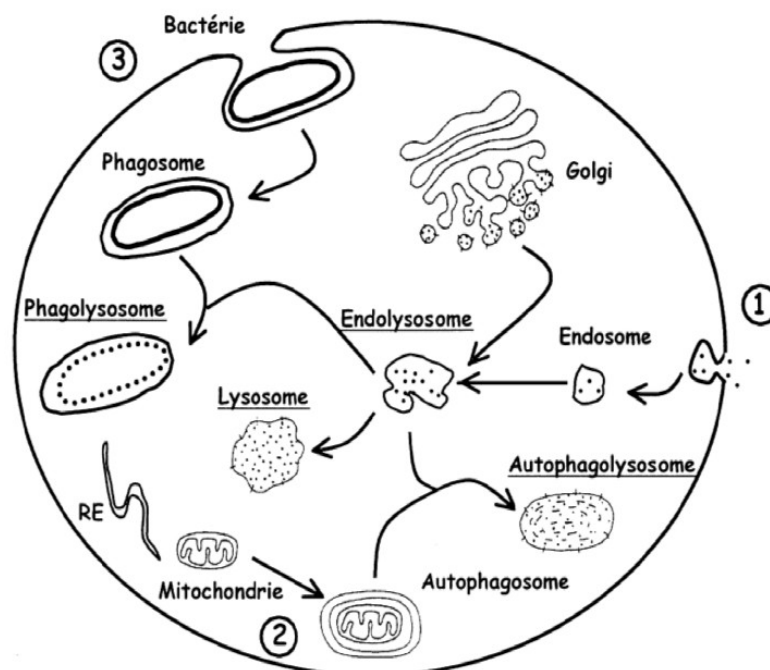


Figure 3.2: Les voies d'approvisionnement des lysosomes.
1: Endocytose; 2: Autophagie; 3: Phagocytose [3].

Il existe deux voies permettant d'approvisionner les lysosomes selon la source des matériaux à dégrader.

3.4.1 Les voies autophagiques

L'autophagie est un processus catabolique intralysosomal permettant aux composants cytoplasmiques en fin de vie d'être amenées vers les lysosomes au sein desquels ils sont dégradés. Elle peut être impliquée également dans le développement, le cancer, les réponses immunitaires et l'apoptose [18]. Trois différents types d'autophagie ont été décrits selon le mécanisme par lequel les glycoprotéines sont amenées aux lysosomes :

- **La macro-autophagie** : est un phénomène régulé impliquant des réactions de conjugaison et l'intervention de kinases [19]. Des travaux récents ont démontré le rôle capital des lysosomes dans le contrôle des réponses cellulaires vis-à-vis les nutriments, pour cette raison il existe plusieurs voies principales qui contrôlent les processus de la macro-autophagie (Figure 3.3). Parmi ceux on trouve la voie dépendent de la cible du complexe 1 de rapamycin TORC1 (Transducer Of Regulated CREB activity 1). Le TORC1 est un indicateur de la quantité de nutriment disponible pour la cellule ainsi que du statut énergétique et oxydoréducteur qui se trouve dans les lysosomes [20,21]. Ce complexe fonctionne comme un intégrateur des signaux de disponibilité des nutriments/d'énergie/potentiel redox. Ce mécanisme moléculaire est plus important pour la régulation de la transcription nucléaire EB (TFEB) (Transcription factor EB) [22]. Ce dernier code pour un facteur de transcription qui coordonne l'expression des hydrolases lysosomales, des protéines membranaires et des gènes impliqués dans l'autophagie [23]. Dans les conditions normales la localisation et l'activité nucléaire du TFEB sont inhibées par la phosphorylation direct dans plusieurs résidus de serine par le mTORC1. Pendant les conditions de jeûne ou durant l'inhibition du mTORC1 le TFEB déphosphorylé se transfère du cytoplasme vers le noyau ce qui entraîne l'activation de ses gènes cibles qui sont connus par leur rôle important dans l'autophagie et l'activation lysosomale (Figure 3.3) [23,24].

D'après la (Figure 3.3), dans des conditions riches en substance nutritive (à gauche), le mTORC1 actif promeut la rétention de TFEB et TFE3 dans le cytosol ainsi que l'inhibition du complexe ULK1/2 et du canal Na^+ sensible à l'ATP et les lysosomes migrent vers la périphérie de la cellule.

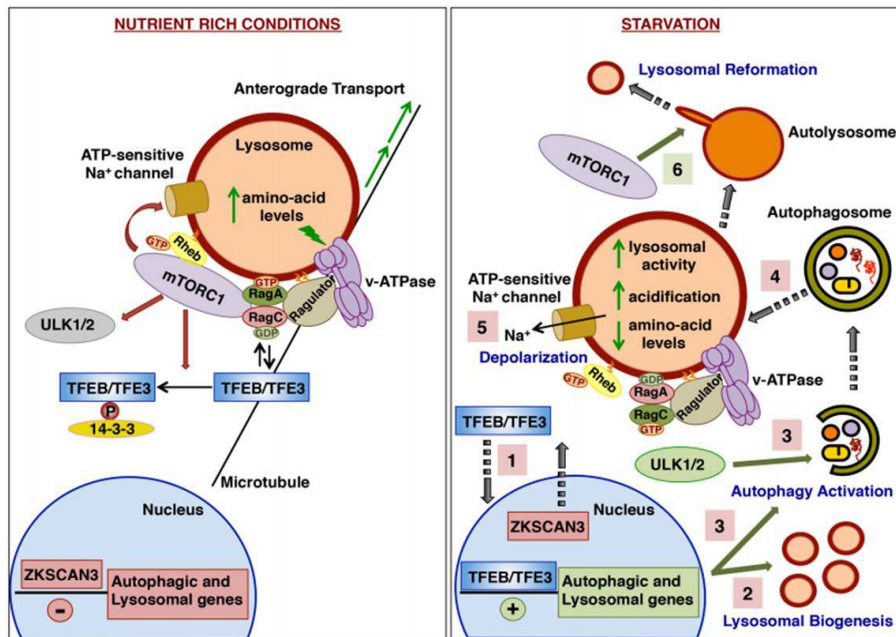


Figure 3.3: Régulation de la fonction lysosomale par mTORC1 dans les conditions normales et de durant le jeûne.

mTORC1: mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase) complex 1; RHEB: Ras homolog enriched in brain; TFE3: transcription factor binding to IGHM enhancer 3; TFEB: transcription factor EB; ULK: uncoordinated 51-like kinase; v-ATPase: vacuolar H⁺-adenosine triphosphatase; ZKSCAN3: zinc finger with KRAB and SCAN domains 3 [23].

Durant les conditions du jeûne (à droite), l'inactivation de mTORC1 va conduire à :

- (1) - une translocation rapide des TFEB et TFE3 vers le noyau,
- (2) - l'induction de la biogenèse lysosomale,
- (3) - l'activation de l'autophagie,
- (4) - l'inactivation de mTORC1 pourrait aussi être nécessaire pour faciliter la fusion entre les autophagomes et les lysosomes,
- (5) - changement du potentiel de la membrane lysosomale,
- (6) - Après des périodes prolongées du jeûne, la réactivation de mTORC1 est indispensable pour induire la reformation autophagique lysosomale [23].

— **La micro-autophagie** : est une voie non sélective qui permet le transfert de matériel cytosolique par invagination de la membrane lysosomiale et les microautophagosomes formés dans les lysosomes sont alors rapidement dégradés. Ce processus est considéré comme un processus lent, constitutif, ATP-dépendant et qui permet la dégradation non-sélective des protéines cytosoliques, y inclus des glycoprotéines [25].

- **L'autophagie chaperone** : ou CMA (chaperone-mediated autophagy) est une autophagie médiée par les molécules chaperonnes hautement sélective. Dans la CMA, les protéines cytoplasmiques, partiellement dégradées par le protéasome, portant une séquence peptidique d'adressage particulière (KEFRQ) qui sont reconnues sélectivement grâce à une molécule chaperonne cytoplasmique, qui permet leur acheminement vers la membrane lysosomale [20]. Les complexes ainsi formés se lient à leur tour à des récepteurs de la membrane lysosomale (LAMP-2A) puis transloquent dans la lumière du lysosome pour être dégradés (Figure 3.4) [6].

Il est à noter que la macro-autophagie et la voie CMA deviennent très actives sous certaines conditions comme le stress oxydant [26].

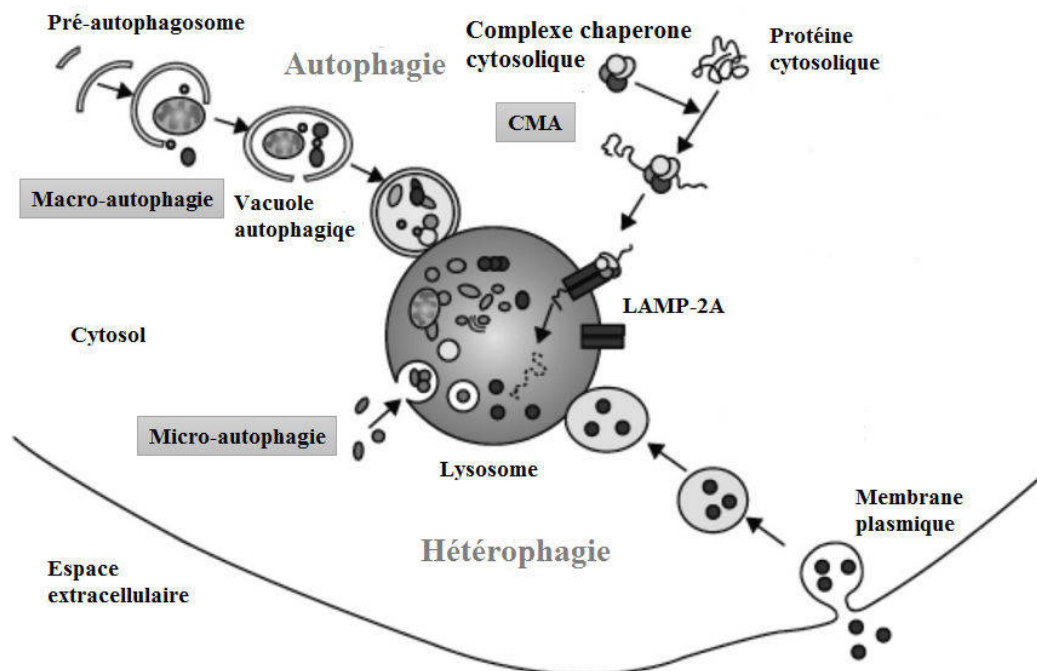


Figure 3.4: Les voies autophagiques et hétérophagiques.
LAMP-2A: Lysosomal-associated membrane protein 2 [28].

3.4.2 Les voies hétérophagiques

Elles correspondent à la digestion des substances exogènes qui rentrent dans la cellule et de la membrane plasmique [4] soit par endocytose : un processus spécifique et régulé dans

lequel interviennent des récepteurs membranaires spécifiques et des vésicules recouvertes de clathrine, ou par pinocytose non spécifique en phase fluide à partir de zones particulières de la membrane plasmique, macropinocytose. Ces deux processus impliquent la formation des endosomes précoces ou phagosomes par invagination de la membrane plasmique. La digestion des substrats endocytés peut commencer dans l'endosome, sachant que leur dégradation totale se déroulera dans un second temps suite à la fusion avec les lysosomes [27].

3.5 Les lysosomes et la mort cellulaire

Les lysosomes ont été considérés pendant longtemps comme des organelles de dégradation, mais il est maintenant admis qu'ils jouent des rôles fondamentaux dans plusieurs processus biologiques et en particulier dans la mort cellulaire [29]. L'implication des lysosomes au processus de la mort cellulaire s'effectue d'une multitude de voies: 1- la nécrose, qui peut être induite par un relargage des protéases lysosomales, 2- l'apoptose, induite par une relâche limitée des caspases lysosomales suivant l'apparition de ruptures modérées à la membrane des lysosomes et 3- la necroptose, sous l'influence d'inducteurs de la mort cellulaire (TNF) [30].

La mort cellulaire autophagique, une mort cellulaire indépendante des caspases, lorsque la régulation de l'autophagie est perturbée [31], elle représenterait un choix ultime pour la cellule résistante à l'apoptose qui serait incapable de composer avec une perte trop importante de ses constituants cytosoliques [32].

Suite à différents types de stress ou sous l'influence d'inducteurs de mort cellulaire (TNF- α , radicaux oxygénés,...), la perméabilité de la membrane lysosomale devient perturbée [33]. L'induction de la déstabilisation de la membrane lysosomale provoque le relargage de contenu acide lysosomal ainsi que leurs puissantes hydrolases et protéases, en particulier les cathepsines, dans le cytoplasme qui peuvent dégrader des molécules essentielles pour la cellule et activer d'autres hydrolases comme les caspases et l'ADNase II. D'autre part, l'acidification faciliterait la dimérisation des membres pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2 et leur capacité à provoquer la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Ceci aboutirait au relargage de molécules mitochondriales tels que le Cyt *c* et les AIF contribuant à la mort cellulaire (Figure 3.5) [34].

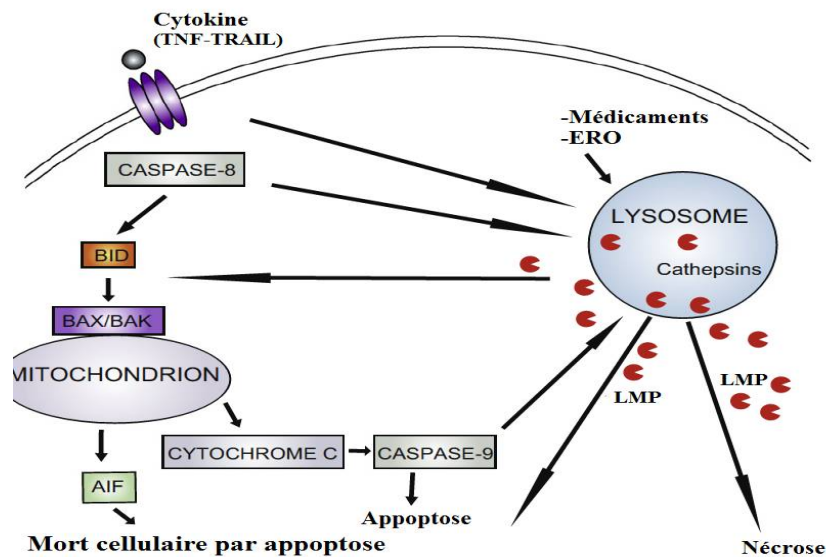


Figure 3.5: L'implication des lysosomes au processus de la mort cellulaire.

LMP: Lysosomal membrane permeabilization; AIF: Apoptosis inducing factor; Bid/Bax/Bak: pro-apoptotiques [35].

La mort cellulaire dépendante du lysosome est déterminée en fonction du degré de perméabilisation lysosomale : une forte perméabilisation aboutirait à une mort par nécrose, alors qu'une plus faible perméabilisation conduirait soit à l'apoptose soit à necroptose ou à l'autophagie [36].

D'ailleurs, l'apoptose et la mort cellulaire autophagique partagent plusieurs similitudes quant aux signaux qui les induisent, en particulier les substances pouvant entraîner un stress cellulaire, ainsi que des protéines qui inhibe ces processus, dont les protéines de la famille de Bcl-2, la protéine Bcl-2 et la protéine Bcl-xL [34]. Ces similitudes suggèrent l'existence de voies signalétiques communes aux deux processus.

Le Bax est un médiateur de la perméabilisation de la membrane mitochondriale extérieure et la libération des facteurs apoptogéniques dans le cytosol, il joue un rôle clé dans les processus de l'apoptose [37,38]. D'une manière similaire, l'apoptose est associé à la perméabilisation de la membrane lysosomale et à la libération des cathepsines lysosomales dans le cytosol [39]. Le lysosome, médiateur de la mort cellulaire, est associé à la dégradation du Bax en séquestrant les protéines 14-3-3, au clivage du Bid activateur du Bax et à la translocation du Bax vers la mitochondrie, qui tous dépendent de la cathepsine D [40,41]. La perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP) suivie par la libération des cathepsines dans le cytosol initie la signalisation apoptotique, souvent via la voie apoptotique intrinsèque. A travers la formation du complexe apoptosome, le Cyt *c* participe à l'activation de la cascade des caspases [42,43]. Il

a été suggéré que les protéases non-caspases contribuent au développement des protéines 14-3-3 et probablement aussi des cathepsines [44].

3.6 Lysosome et stress oxydant

Les atteintes directes de la membrane lysosomale via les ERO issues durant le stress oxydatif ont été largement étudiées. Ces atteintes résultent souvent par une fuite cytosolique des hydrolases puissantes qui pourraient provoquer des dommages intracellulaires [45]. L'ampleur des atteintes cellulaires varie selon l'intensité d'oxydation qui détermine le degré de la perturbation de la membrane lysosomale. La disponibilité progressive du fer sous forme de faible poids moléculaire durant ces conditions se résulte par un potentiel graduel de la réaction intra-lysosomale de Fenton provoquant les altérations lysosomales [46,47].

Le stress oxydant peut aussi toucher la perméabilité de la membrane lysosomale en induisant la trans-jonction des protéines de la membrane lysosomale via des liaisons disulphides [48]. Cette agrégation partielle des protéines de la membrane lysosomale peut aboutir à l'augmentation de la perméabilité des protons lysosomals et le changement du pH lumineux, ainsi que le potentiel membranaire et la perte des protons. Donc, la perméabilité des membranes lysosomales est dépendante de l'état redox des groupements thiols membranaires [49].

Le stress cellulaire provoque une autophagie visant la suppression des macromolécules et des organites endommagés. Les lysosomes possèdent de nombreux mécanismes sensibles au stress et qui provoquent la biogenèse coordonnée des autophagosomes et des lysosomes [45].

3.7 Interaction entre les dysfonctionnements lysosomals et mitochondrials

Plusieurs indices progressifs suggèrent que les lysosomes peuvent constamment communiquer avec d'autres structures cellulaires pour effectuer des programmes métaboliques spécifiques. Le dysfonctionnement mitochondrial peut aussi perturber la structure et la fonction des lysosomes [50]. D'une manière spécifique, l'inhibition de la fonction mitochondriale suivant la suppression de la protéine mitochondrial AIF, ainsi que l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondrial modifient l'activité lysosomale et provoque l'apparition de grandes vacuoles lysosomales [40].

Les mitochondries sont des organites dynamiques qui modifient leur distribution, leur structure et leur fonction selon les circonstances telles la disponibilité d'oxygène ou le stress. Le dysfonctionnement mitochondrial est caractérisé par l'accumulation croissante des macromolécules non digérées dans les lysosomes. Cette accumulation massive des substances affecte la fonction lysosomale et détériore le flux autophagique qui peut influencer sur la qualité du contrôle cellulaire des organites telle la mitochondrie [51].

Les voies de l'autophagie représentent un système de défense majeur, à côté de leur rôle dans la fourniture des substances nutritives aux cellules, qui permettent aussi la survie des cellules réagissant vis-à-vis divers agents stressants [52]. Une fois les dommages mitochondriaux deviennent excessivement extrêmes ils provoquent la dissipation du potentiel de la membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et les parties endommagées de la mitochondrie ne peuvent pas se fusionner avec la mitochondrie saine adjacente.

3.8 Dysfonctionnement lysosomal induit par l'AVP

Les lysosomes sont considérés à la fois comme source et également cible des ERO qui peuvent par conséquent activer la cascade protéolytique en provoquant la libération de la tyrosine et la protéolyse générale [53].

Le mécanisme exact du dysfonctionnement lysosomal induit par l'AVP n'est pas encore élucidé mais il a été rapporté que son effet toxique se manifesterait principalement par un stress oxydant et la génération accrue de radicaux libres [54]. En outre, d'autres études ont rapporté que ce dysfonctionnement est médié via un dysfonctionnement mitochondrial [55].

Des études récentes ont signalé que l'exposition des hépatocytes à l'AVP augmente la fragilité des membranes lysosomales, suite à la formation des ERO intracellulaires tel le H_2O_2 par l'activation métabolique médiée par le CYP450 [56]. Le H_2O_2 peut facilement traverser la membrane lysosomale en raison de sa nature lipophile. Dans le compartiment acide du lysosome, le fer libre réduit (Fe^{2+}), provenant de la dégradation des macromolécules riches en fer, catalyse rapidement des réactions de type Fenton, la conversion des molécules de H_2O_2 en radicaux ($^{\circ}OH$) générant un stress oxydant [57]. Le radical ($^{\circ}OH$) résultant pourrait déstabiliser l'intégrité de la membrane lysosomale et libérer les protéases digestives (cathepsines). Ces derniers pourraient modifier directement les membranes mitochondriales externes, ou indirectement en activant le

Bax, la Bid et d'autres enzymes lytiques y compris la phospholipase A2 (PLA2) qui sont à leur tours induisent l'ouverture des PTPm et la libération du Cyt *c* et l'effondrement du potentiel de la membrane interne mitochondriale [32]. La libération du Cyt *c* pourrait aussi potentialiser l'induction d'un stress oxydant par l'augmentation de la diffusion de H₂O₂ mitochondrial dans les lysosomes en générant plus de radicaux hydroxyles lysosomaux (voir figure 3.6) [56].

Les radicaux libres oxygénés ainsi générés déstabilisent la membrane lysosomale par peroxydation des lipides membranaires et dégradation des protéines membranaires [58]. Le 4-HNE est un produit de la peroxydation lipidique, qui réagit avec des protéines lysosomales et provoque leur carbonylation. L'accumulation de ces protéines modifiées par le 4-HNE peut provoquer la mort cellulaire via la rupture de la membrane lysosomale [59]. Cette cascade d'événements pourrait finalement aboutir à la lyse de la membrane et à la protéolyse cellulaire générale, les processus qui se terminent par la mort cellulaire [56].

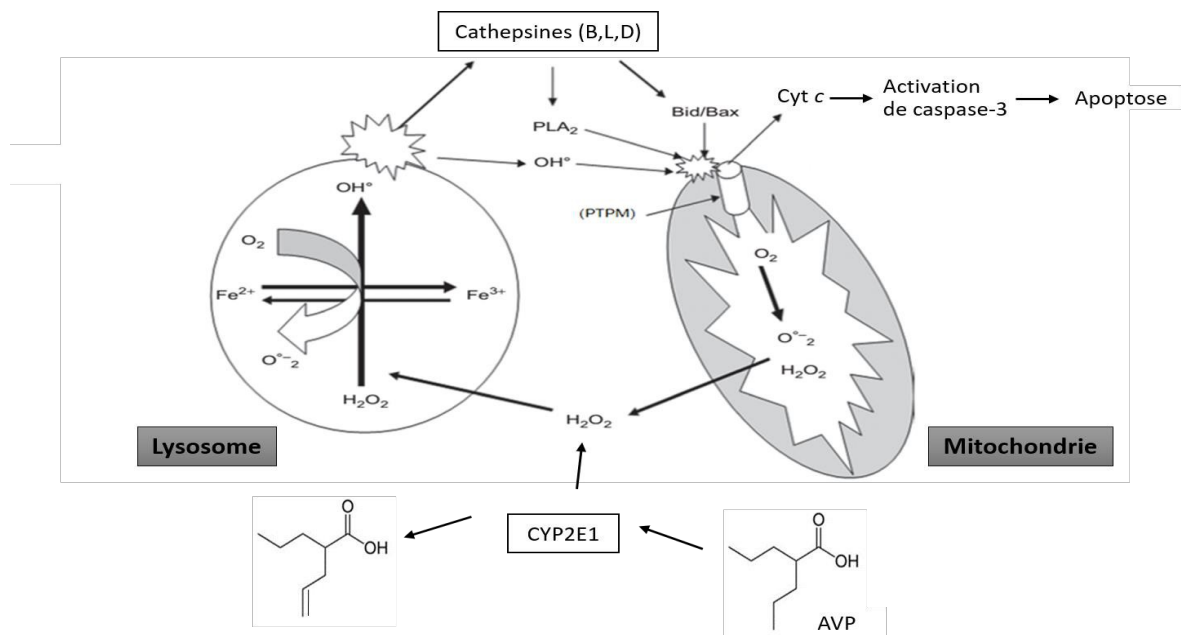


Figure 3.6: Mécanisme proposé pour le dysfonctionnement lysosomal induit par l'AVP. (d'après [53]). AVP: acide valproïque; CYP2E1: cyochrome P450 2E1; Cyt *c*: cytochrome *c*; PLA2: phospholipase A2; PTPm: pores de transition de la perméabilité mitochondriale.

Références bibliographiques

- [1] Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996; 12:575-625.
- [2] Cohn ZA, Hirsch JG, Wiener E. The cytoplasmic granules of phagocytic cells and the degradation of bacteria. Edition 3. Londres : Churchill; 1963:126-144.
- [3] Bellier S. Les maladies lysosomales de l'homme et des animaux domestiques. *Revue Méd Vét.* 2001; 152:435-446.
- [4] Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J.* 2011; 30:3481-3500.
- [5] Steinberg TH, Swanson JA. Measurement of phagosome-lysosome fusion and phagosomal pH. *Methods Enzymol.* 1994; 236:147-160
- [6] Winchester BG. Lysosomal membrane proteins. *Eur J Paed Neurol.* 2001; 5:11-19.
- [7] Connus S, Simon HU. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76:1374-1382.
- [8] Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 2003; 13:137-145.
- [9] Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22:124-131.
- [10] Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10:623-635.
- [11] Barrett A, Woessner J, Rawlings N. *Handbook of Proteolytic Enzymes.* Edition 2. London: Academic Press; 1998.
- [12] Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32:160-164.
- [13] Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, Jordans S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie.* 2008; 90:194-207.
- [14] Bühling F, Gerber A, Häckel, C, et al. Expression of cathepsin K in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20:612-619.
- [15] Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6:764-775.

- [16] Cabezas JA. Some comments on the type references of the official nomenclature (IUB) for β -N-acetylglucosaminidase, β -N-acetylhexosaminidase and β -N-acetylgalactosaminidase. *Biochem J.* 1989; 261:1059-1060.
- [17] Knapp S, Vocadlo D, Gao Z, et al. NAG-thiazoline, an N-acetyl-beta-hexosaminidase inhibitor that implicates acetamido participation. *J Am Chem Soc.* 1996; 118:6804-6805.
- [18] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008; 451:1069-1075.
- [19] Dunn WA Jr. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 1994; 4:139-143.
- [20] Uchiyama Y, Koike M, Shibata M, Sasaki M. Autophagic neuron death. *Methods Enzymol.* 2009; 453:33-51.
- [21] Liu C, Gao Y, Barrett J, Hu B. Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. *J Neurochem.* 2010; 115:68-78.
- [22] Huang C, Yitzhaki S, Perry CN, et al. Autophagy induced by ischemic preconditioning is essential for cardioprotection. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010; 3:365-673.
- [23] Rosa Puertollano. mTOR and lysosome regulation. *F1000Prime Rep.* 2014; 6:52.
- [24] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008; 132:27-42.
- [25] Ahlberg J, Glaumann H. Uptake-microautophagy-and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis. *Exp Mol Pathol.* 1985; 42:78-88.
- [26] Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, et al. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell.* 2004; 15:1101-1111.
- [27] Maire I. Le système lysosomal dans la protéolyse : panorama des maladies lysosomiales. *Bull Acad Natle Méd.* 2012; 196:1561-1574.
- [28] DMartinez-Vicente M, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol.* 2007; 6:352-361.
- [29] Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. Lysosome-related organelles. *FASEB J.* 2000; 14:1265-1278.

- [30] Guicciardi ME¹, Deussing J, Miyoshi H, et al. Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest.* 2000; 106:1127-1137.
- [31] Ono K, Kim SO, Han J. Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor α -induced cell death. *Mol Cell Biol.* 2003; 23:665-676.
- [32] Pattingre S, Tassa A, Qu X et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005; 122:927-939.
- [33] Nilsson C, Johansson U, Johansson AC, et al. Cytosolic acidification and lysosomal alkalization during TNF- α induced apoptosis in U937 cells. *Apoptosis.* 2006; 11:1149-1159.
- [34] Johansson AC, Appelqvist H, Nilsson C, et al. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis.* 2010; 15:527-540.
- [35] Groth-Pedersen L, Jäättelä M. Combating apoptosis and multidrug resistant cancers by targeting lysosomes. *Cancer Lett.* 2013; 332:265-274.
- [36] Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene.* 2004; 23:2881-2890.
- [37] Bidère N, Lorenzo HK, Carmona S, et al. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem.* 2003; 278:31401-31411.
- [38] Baumgartner HK, Gerasimenko JV, Thorne C, et al. Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293:G296-307.
- [39] Lin Y, Epstein DL, Liton PB. Intralysosomal iron induces lysosomal membrane permeabilization and cathepsin D-mediated cell death in trabecular meshwork cells exposed to oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51:6483-6495.
- [40] Baker MJ, Palmer CS, Stojanovski D. Mitochondrial protein quality control in health and disease. *Br J Pharmacol.* 2014; 171:1870-1889.
- [41] Chwieralski CE, Welte T, Bühling F. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis.* 2006; 11:143-149.
- [42] Bröker LE, Huisman C, Span SW, et al. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64:27-30.

- [43] Brunk UT, Neuzil J, Eaton JW. Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep.* 2001; 6:91-97.
- [44] Kågedal K, Johansson U, Ollinger K. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J.* 2001; 15:1592-1594.
- [45] Windelborn JA, Lipton P. Lysosomal release of cathepsins causes ischemic damage in the rat hippocampal slice and depends on NMDA-mediated calcium influx, arachidonic acid metabolism, and free radical production. *J Neurochem* 2008; 106:56-69.
- [46] Starke PE, Gilbertson JD, Farber JL. Lysosomal origin of the ferric iron required for cell killing by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985; 133:371-379.
- [47] Persson HL, Yu Z, Tirosh O, Eaton JW, Brunk UT. Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34:1295-1305.
- [45] Zdolsek J, Zhang H, Roberg K, Brunk U. H₂O₂-mediated damage to lysosomal membranes of J-774 cells. *Free Radic Res Commun.* 1993; 18:71-85.
- [49] Kurz T, Leake A, von Zglinicki T, Brunk UT. Lysosomal redox-active iron is important for oxidative stress-induced DNA damage. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1019:285-288.
- [50] Boya P, Andreau K, Poncet D, et al. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med.* 2003; 197:1323-1334.
- [51] Zhao M, Eaton JW, Brunk UT. Protection against oxidant-mediated lysosomal rupture: a new anti-apoptotic activity of Bcl-2? *FEBS Lett.* 2000; 485:104-108.
- [52] Yin L, Stearns R, González-Flecha B. Lysosomal and mitochondrial pathways in H₂O₂-induced apoptosis of alveolar type II cells. *J Cell Biochem.* 2005; 94:433-445.
- [53] Pourahmad J, Hosseini MJ, Eskandari MR, et al. Mitochondrial/lysosomal toxic crosstalk plays a key role in cisplatin nephrotoxicity. *Xenobiotica.* 2010; 40:763-771.
- [54] Chang TK, Abbott FS. Oxidative stress as a mechanism of valproic acid associated hepatotoxicity. *Drug Metab Rev.* 2006; 38:627-639.
- [55] Tong V, Teng XW, Chang TKH, Abbott FS. Valproic acid II: effects on oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and cytotoxicity in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicol Sci.* 2005; 86:436-443.
- [56] Pourahmad J, Eskandari MR, Kaghazi A, et al. A new approach on valproic acid induced hepatotoxicity: involvement of lysosomal membrane leakiness and cellular proteolysis. *Toxicol In Vitro.* 2012; 26:545-551.

- [57] Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem Cell Biol.* 2008; 129: 389-406.
- [58] Baird SK, Kurz T, Brunk UT. Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem J.* 2006; 394:275-283.
- [59] Marques C, Pereira P, Taylor A, et al. Ubiquitin-dependent lysosomal degradation of the HNE-modified proteins in lens epithelial cells. *FASEB J.* 2004; 18:1424-1426.

Chapitre 4

Produits naturels et atteintes hépatiques

4.1 Produits naturels et atteintes hépatiques

Le rôle des substances bioactives d'origine végétale est largement montré dans la protection contre plusieurs maladies en raison de leurs propriétés hépatoprotectrices et leurs interactions éventuelles avec de nombreuses enzymes [1]. Des études évaluant l'activité pharmacologique et biologique des composés bioactives ont montré qu'ils jouent un rôle clé dans la protection de la fonction hépatiques vis-à-vis le dysfonctionnement induit par certains xénobiotiques [2,3]. Il a été constaté que ces composés peuvent prévenir l'intégrité structurelle du foie et limiter les excès des dépôts lipidiques hépatiques ou stéatose [4]. De nombreux travaux indiquent que des dysfonctionnements hépatiques ou les atteintes de cirrhose ont été améliorés dans certains cas suite à l'administration des composés phénoliques possédant des propriétés capables de moduler le fonctionnement des enzymes hépatiques [3,4,5].

Les études expérimentales concernant les mécanismes d'AVP induisant l'hépatotoxicité chez les rats révèlent qu'un large intervalle de doses de valproate de sodium (250-1000 mg/kg), durant 1 à 9 semaines, peut engendrer des lésions hépatiques et une stéatose hépatique microvésiculaire [6]. Selon la littérature certains composés végétaux sont dotés d'un effet hépatoprotecteur vis-à-vis les lésions hépatiques induites par une dose d'AVP appartenant à l'intervalle précédente. Il a trouvé que le prétraitement par le safran, huile essentiel dérivée du safran, a atténué le dysfonctionnement hépatique induit par l'AVP et neutralise les dommages structuraux, la

déplétion d'ATP hépatique, la réduction du contenu des antioxydants totaux et la modulation de l'apoptose, ces effets ont été accompagnés par une augmentation significative de l'expression du gène de la CPT [7]. Les extraits du safran (*Crocus sativus L*) [8], de *Petroselinum crispum* [9] ont amélioré l'hépatotoxicité et ont modérés les altérations histopathologiques induites par l'AVP. En outre l'administration d'huile de *Nigella sativa* a prévenu l'hépatotoxicité des rats recevant l'AVP via son activité antioxydante [10]. Comme il a été montré que les rats traités par l'huile extraite du fenouil montrent une certaine protection contre les dommages hépatiques et une diminution de la stéatose microvésiculaire issues d'une altération hépato-rénale induites par l'AVP [11].

4.1.1 Produits naturels et dysfonctionnement mitochondrial

La protection spécifique contre le dysfonctionnement mitochondrial des hépatocytes joue un rôle préventif dans les premiers stades des processus physiopathologiques des atteintes hépatiques [12]. Les mécanismes de la protection du foie contre les effets délétères induits par différents agents toxiques, notamment les ERO, pourraient être liés à la protection et la régulation des fonctions mitochondriales via les métabolites secondaires qui sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la génération des radicaux libres et s'opposer à l'oxydation des macromolécules [1,13]. Ces molécules peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant mitochondrial [14], par capture directe des ERO, par chélation de métaux de transition tel le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton) ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production d'ERO (formation de complexe inhibiteur-enzyme) comme dans le cas de la xanthine oxydase (XO) [15, 16]. Franco et ses collaborateurs [17] ont observé que les flavonoïdes avaient un effet préventif contre le dysfonctionnement mitochondrial et les dommages oxydatifs en inhibant la formation des ERO et la peroxydation lipidique.

Il est bien établi que le déséquilibre du métabolisme énergétique cellulaire et du statut redox activent les mécanismes menant à la nécrose et l'apoptose cellulaires via la participation importante de l'ouverture des PTPm ainsi que la compartimentalisation du calcium cellulaire [18]. Le taux d'ATP qui détermine l'association de l'ouverture des PTPm soit à la nécrose ou à l'apoptose cellulaire. Les propriétés antioxydantes de plusieurs flavonoïdes naturelles protègent contre le déclenchement de l'ouverture des PTPm, ils sont donc potentiellement capables d'agir

comme des agents cytoprotecteurs contre la nécrose et l'apoptose [19]. Il semble que plusieurs mécanismes peuvent intervenir dans ce processus. Wided et ses collaborateurs [20] ont rapporté que les flavonoïdes de la propolis réduisent le statut oxydatif mitochondrial et empêchent le gonflement mitochondrial induit par le calcium. Il a été trouvé que certains flavonoïdes peuvent augmenter l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et diminuer l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax. En augmentant l'expression des Bcl-2 ces composés servent aussi à l'inhibition de l'ouverture des PTPm ainsi la sortie du Cyt *c* [21].

Cependant que, plusieurs études ont rapportée que les flavonoïdes possèdent un double comportement, antioxydants ou pro-oxydants [22,23], car les effets reviennent à la nature, la concentration des flavonoïdes et aux types des cellules utilisées. Preston et ses collaborateurs [24] ont montré que certains flavonoïdes peuvent promouvoir l'apoptose en association avec des pro-oxydant/PTPm induisant des activités anticancéreuses. En outre, Salvi et ses collaborateurs [25] ont montré que les concentrations élevées (50 μ M) de la genistein inhibent la respiration des mitochondries hépatiques du rat. D'autres études ont démontré l'effet du curcumine et ses dérivées sur l'ouverture des PTPm est impliquée dans le processus d'apoptose [22,26].

Elingold ses collaborateurs [27] ont mentionné que les flavonoïdes prénylées altèrent le métabolisme énergétique hépatique en agissant comme un agent découplant mitochondrial et en inhibant les activités enzymatiques liées à la chaîne respiratoire. Ils ont suggéré que la prénylation confère aux flavonoïdes un caractère fortement lipophile qui se traduit par une affinité importante aux membranes biologiques. Ainsi, Sakagamiet ses collaborateurs [28] ont révélé que les composés polyphénoliques (flavones, falvonols, 3-hydroxyflavones) et les flavonoïdes substitués par les isoprenoides provoquent l'apoptose chez des lignés cellulaires buccales via des mécanismes impliquant leurs interactions avec l'ouverture des PTPm de la cellule cancéreuse et la libération du Cyt *c*. D'autres travaux ont prouvé que l'épigallocatechin-3-gallate, polyphénol issue du thé vert, a modéré le facteur nucléaire NF-kB ainsi que les voies de signalisation de l'inflammation au niveau des cellules cancéreuses [29].

4.1.2 Produits naturels et dysfonctionnement lysosomal

Les acides phénoliques, la vitamine E et certains médicaments tels les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent prévenir l'intégrité des membranes lysosomales et limiter les fuites enzymatiques en diminuant leurs perméabilités [30].

Il a été rapporté que le curcumine peut induire l'autophagie à travers l'inhibition de la voie Akt-mTORC, en augmentant le flux d'autophagie chez les cellules HCT116 du cancer du côlon humain, et en stimulant la fonction lysosomale par la suppression de mTORC activateur de TFEBw qui contrôle l'autophagie et la biogenèse lysosomale [31]. Le pré et co-traitement avec l'acide sinapique, acide phénolique dérivé de l'acide cinnamique possédant des substitutions 3,5-diméthoxyl et 4 hydroxyles dans le groupe phényle de l'acide cinnamique, a restauré les enzymes lysosomales myocardiques chez les rats traités par l'isoproterenol [32]. Il a été prouvé que le prétraitement des rats par l'isoprenaline en combinaison avec la quercetin et α -tocopherol [33] ou par la rutin [34] a maintenu l'intégrité membranaire lysosomale du tissu cardiaque en inhibant la libération des enzymes lysosomales: la ACP, la β -GAL, la β -NAG et la β -GLU.

En outre, un prétraitement avec des extraits des plantes médicinales riches en composés antioxydants tels les polyphénols a prévenu les lysosomes contre les radicaux libres et la peroxydation lipidique en gardant leurs intégrité, ceci pourrait être attribué à leur effet stabilisateur de la membrane lysosomale [35]. Cet effet se manifeste par la diminution de la libération d'enzymes lysosomales, médiateurs importants des pathologies inflammatoires [36].

Les travaux réalisés sur les effets protecteurs des molécules bioactives ont montré que ceux-ci peuvent diminuer les marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) [37], et qu'ils étaient associés à une diminution des taux des cytokines circulantes (IL-8, IL-13 et IFN- α) [38].

D'autres études ont rapporté que certains métabolites secondaires se comportent également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation [39] en inhibant l'activation de NF- κ B, facteur de transcription impliqué dans la régulation de la synthèse d'iNOS, qui agit sur la production de NO [39,40]. Il a été indiqué qu'ils peuvent inhiber aussi la voie de cyclooxygénase (COX) (enzyme qui produit les prostaglandines) et la voie de la lipooxygénase et qu'ils pouvaient agir sur les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique responsable de processus inflammatoire [40].

4.2 Description de la famille Scrophulariaceae

La famille Scrophulariacées ou Scrophulariaceae (du latin *scrouaria* : herba) comprend environ 5100 espèces réparties en 269 genres [41]. Les espèces de cette famille sont des plantes herbacées, rarement arbustives, elles peuvent être plus ou moins parasites, aquatiques ou grimpantes et dépourvues de phloème interne; généralement elles se trouvent dans les régions tempérées de l'hémisphère nord [42].

La nouvelle classification phylogénétique donne à cette famille un nouveau nom : Plantaginaceae et de nombreux genres ont récemment été transférés à d'autres familles [43]. Le tableau (4.1) présente quelques exemples sur les sous-familles, les tribus et des genres de cette famille.

Table 4.1: Classification de la famille Scrophulariaceae [44].

Famille	Sous famille	Tribus	Genre
Scrophulariaceae «Plantaginaceae»	Scrophularioideae	Scrophularieae	<i>Scrophularia</i>
		Anthirrhineae	<i>Anarrhium</i>
			<i>Antirrhinum</i>
			<i>Chaenorrhinum</i>
			<i>Cymbalaria</i>
			<i>Kickxia</i>
<i>Linaria</i>			

4.3 Description du genre *Linaria*

Le genre *Linaria* comprend environ 200 espèces dont une bonne partie est largement distribué en région méditerranéenne comme la Turquie, l'Italie et l'Espagne et en Asie orientale [45]. Elles doivent leur nom à leurs feuilles étroites évoquant celles du lin cultivé. Les plantes de ce genre sont herbacée soit dressées ou couchée annuelles ou vivaces de 10-30 cm à feuilles simples et étroites (souvent linéaires et rarement lobées ou dentées). Fleurs solitaires, axillaire, en grappe ou en épis terminaux. Le calice profondément divisé en cinq lobes inégaux, souvent courts. La corolle bilabée à tube renflé et prolongée à la base par un éperon. La lèvre supérieure est formée

de deux lobes légèrement réfléchis, la lèvre inférieure de trois lobes. Cette lèvre présente un palais saillant fermant la gorge, bilobé, maculé de couleurs vives, généralement velu. Quatre étamines. Le fruit est une capsule polyspermeovoïde à deux loges et à déhiscence porcidé.

En Algérie, ce genre comprend 39 espèces et sous-espèces [46] dont plusieurs sont renommées comme des plantes utilisées dans la médecine populaire dans différentes régions : *Linaria disita* dans le haut plateau oranais, *Linaria axiflora* au Mزاب, *Linaria peltieri*, *Linaria virgata*, *Linaria tingitana* et *Linaria reflexa* qui se trouve dans toute l'Algérie et qui est utilisée en usage externe pour le traitement de certaines dermatoses [47], elle est également connue sous le nom « Oum lajrah » pour la raison de son pouvoir cicatrisant. Le genre *Linaria* est aussi bien connu avec son vertu thérapeutique et plusieurs études ont montré que certaines espèces sont indiquée dans le traitement de plusieurs maladies telles les problèmes digestifs, les troubles urinaires, les hémorroïdes, les éruptions cutanées ainsi que les désordres vasculaire [43].

4.3.1 Propriétés pharmacologiques et utilisation en médecine traditionnelle

Le genre *Linaria* inclut plusieurs espèces connues et utilisées dans la médecine populaire. L'espèce *L. vulgaris* est généralement prescrite traditionnellement comme diurétique, laxative et aussi anti-inflammatoire [48]. Au Nord-Est de la Chine cette espèce est utilisée contre la toux et pour des variétés de troubles d'asthme [49]. Alors que l'espèce japonaise *L. japonica* connue au Japon sous le nom de "unran" est utilisée comme diurétique, purgative [50] et laxatifs [51] avec l'espèce *L. Cymbalaria* qui se caractérise aussi par des propriétés toniques et antiscorbutiques [52,53].

4.3.2 Données phytochimiques et activités biologiques

Les études phytochimiques menées sur plusieurs espèces du genre *Linaria* ont mis en évidence la présence des principales classes des métabolites secondaires [54] tels les iridoïdes [55], les flavonoïdes et leurs glycosides [56], les monoterpénoïdes [57], les diterpénoïdes [58], les triterpénoïdes [59], les alcaloïdes [49,60] et les phenylethanoides [50]. La majorité de ces produits sont connus par leurs activités biologiques qui ont été démontrés à travers des études *in vitro* et *in vivo* [61].

De nombreuses études pharmacologiques ont rapportés plusieurs effets biologiques des composés isolés à partir de *L. saxatilis* var. *saxatilis* et *L. reflexa* Desf. tels que les diterpénoïdes à squelette néo-clérodane et des flavonoïdes dotés d'activités cytotoxiques [62, 63]. Une autre étude faite sur plusieurs lignés cellulaires a montré que les flavones isolés de *L. reflexa* Desf., notamment la pectolinargénine, la linariine et la pectolinarine sur plusieurs lignés cellulaires ont manifesté un effet antiproliférative et un effet inhibiteur vis-à-vis l'acétylcholinestérase [63,64].

Des extraits dérivés de différentes espèces de *Linaria* ont montré des propriétés pharmacologiques significatives telles antibactériennes [65], anti-inflammatoires et analgésique [66], antioxydante [67] et un effet inhibiteur de α -glucosidase [68].

4.3.3 Les principales classes de composés secondaires

Ce genre est bien connu avec sa richesse en métabolites secondaires tels que les iridoïdes, les diterpénoïdes, les flavonoïdes et les alcaloïdes [43].

4.3.3.1 Les terpénoïdes

Les terpènes (terpénoïdes) forment une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes. En fonction du nombre n (unités d'isoprène reliées), on peut distinguer :

- **Les monoterpénoïdes:** sont les plus simples constituants des terpènes, deux unités d'isoprène reliées, dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. Cette classe est moins fréquente dans le genre *Linaria*, seulement trois ont été isolés à partir de *L. japonica* [57] et *L. capraria* [69].
- **Les diterpénoïdes:** ce sont des dérivés d'hydrocarbures en quatre unités isopréniques dont ils sont présents seulement dans deux espèces *L. japonica* [70] et surtout *L. saxatilis* [71].
- **Les triterpénoïdes:** ce sont ceux à six unités isopréniques comprenant les stéroïdes, les oléanes et les lupanes, par contre la majorité ont été isolés à partir de *L. vulgaris*, ils sont peu fréquents dans le genre *Linaria*.

- **Les iridoïdes:** ce sont des composés monoterpéniques caractérisés par un squelette cyclopenta[c]pyrane, parfois désigné par le terme iridane, principalement sous forme d'hétérosides ou glycosides d'iridoïdes. Ils sont considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques pour les genres de la tribu Scrophularioideae-Antirrhineae de la famille Scrophulariaceae, y compris *Linaria* [72]. Les iridoïdes les plus fréquents sont les dérivés de 6-acyl antirrhinoside et de 5-deoxyantirrhinoside. De nombreux travaux se sont intéressés aux activités biologiques et pharmacologiques des iridoïdes. Ces travaux ont montré que ces composés possèdent de multiples activités biologiques de type anti-allergique, hypotensive, hépatoprotective, hypoglycémiant, purgative, anti-inflammatoire, antispasmodique, antitumoral, antiviral et antibiotique [73].

4.3.3.2 Les polyphénols

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisé en une dizaine de classes chimiques qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Il existe de nombreuses classes de polyphénols : phloroglucinols, quinones, stilbénoides, coumarines, anthocyanes, tanins, flavonoïdes, acides-phénols,... [74]. Ces structures peuvent également être acylées, glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures et de polarités [75].

Les composés phénoliques sont une famille thérapeutique et économique intéressante. Ils sont exploités en phytothérapie et dans des spécialités pour des propriétés vasculoprotectrices (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), antispasmodiques (phloroglucinols) et suscitent beaucoup d'intérêt par leur potentiel antioxydant [75]. Nous ne citons ici que les classes connues dans le genre *Linaria* :

- **Les acides phénoliques:** ils possèdent au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes: les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique [76]. Cette classe est notamment bien répandue dans le genre *Linaria* en particulier dans l'espèce *L. vulgaris* [77].
- **Les composés phénoliques glycosylés:** cette classe des composés phénoliques comportant des structures peuvent également être diversement substituées (glycosylées). Elles se

trouvent dans certaines espèces telles que *L. japonica* [78] et *L. vulgaris* [79].

- **Les flavonoïdes:** ce sont des composés polyphénoliques dont le terme est un nom collectif pour les pigments de plantes, principalement dérivés du benzo- γ -pyrone, qui est un synonyme de chromone [80]. Leur structure comprend un squelette composé de deux cycles aromatiques (A et B) porteurs de plusieurs fonctions phénol et réunis par une chaîne de trois atomes de carbone, ces derniers étant le plus souvent engagés dans un hétérocycle avec un atome d'oxygène [81].

Les flavonoïdes peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, lequel peut-être ouvert et recyclé en un motif furanique (dihydrofuranone). Généralement, ils peuvent être hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4', 5'et/ou 6'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés [82].

Dans les plantes, les flavonoïdes peuvent être présents sous forme C-ou O-glycosylés. Les formes libres, sans sucres attachés sont appelés les génines ou aglycones. Les «flavonoïdes minoritaires» sont représentés par les chalcones, les dihydrochalcones, les auronnes, les flavanones, les dihydroflavonols et les anthocyanidols [83]. Généralement, les flavonoïdes sont aussi très répandus dans le genre *Linaria*, notamment les flavones O-glycosylés, les flavonols et leurs glycosylés et aglycones et peu des auronnes et flavanones [43].

4.3.3.3 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques hétérocycliques avec un atome d'azote et à caractère alcalin contenant plus de 10000 à 12000 différentes structures [84]. Ils sont doués des propriétés physiologiques prononcées même à faible dose. Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine). Ces composés sont beaucoup fréquents dans ce genre notamment dans l'espèce *L. vulgaris* [85].

4.4 L'espèce *Linaria tingitana*

La flore Algérienne se caractérise par un pourcentage élevé de plantes endémiques. En fonction de la population ou du dialecte du pays, l'espèce *L. tingitana* porte différents noms, d'où la difficulté de pouvoir très souvent l'identifier. L'espèce *L. tingitana* Boiss. & Reut. (figure 4.1) est distribuée dans l'Afrique du Nord en Algérie et en Maroc. La détermination botanique a été réalisée par monsieur le Dr. Sarri Djamel, du département de Biologie, Université Mohamed Boudiaf de M'Sila (spécimen de référence N° 08/2009/CCN12).



Règne: Plantae

Sous-règne: Tracheobionta

Embranchement : Viridaplantae

Classe: Magnoliopsida

Sous-classe: Asteridae

Ordre: Scrophulariales

Famille: Scrophulariaceae

Sous famille: Scrophularoideae

Tribus: Antirrhineae

Genre: *Linaria*

Espèce: *Linaria tingitana* Boiss.&Reut.

Figure 4.1: Classification botanique de l'espèce *Linaria tingitana* Boiss. & Reut.

Références bibliographiques

- [1] Mahesh A, Jeyachandran R, Cindrella L, et al. Hepatocurative potential of sesquiterpene lactones of *Taraxacum officinale* on carbon tetrachloride induced liver toxicity in mice. *Acta Biol Hung*. 2010; 61:175-90.
- [2] van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, et al. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 214:755-759.
- [3] Bhandarkar MR, Khan A. Antihepatotoxic effect of *Nymphaea stellata* willd., against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in albino rats. *J Ethnopharmacol*. 2004; 91:61-64.
- [4] Song H, Lai J, Tang Q, Zheng X. Mulberry ethanol extract attenuates hepatic steatosis and insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *Nutr Res*. 2016; 36:710-8.
- [5] Wang JQ, Li J, Zou YH, et al. Preventive effects of total flavonoids of *Litsea coreana* leve on hepatic steatosis in rats fed with high fat diet. *J Ethnopharmacol*. 2009; 121:54-60.
- [6] Kesterton JW, Granneman RG, Machinist JM. The hepatotoxicity of valproic acid and its metabolites in rats. I. Toxicologic, biochemical and histopathologic studies. *Hepatology*. 1984; 4:1143-1152.
- [7] Hamza AA, El Hodairy F, Badawi A. Safranin ameliorates sodium valproate-induced liver toxicity in rats by targeting gene expression, oxidative stress and apoptosis. *J Biomed Pharm Res Soc*. 2015; 4: 46-60.
- [8] Okdah YA, Ibrahim SA. Effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) on sodium valproate-induced histological and histochemical alterations in liver of albino rats. *Int J Adv Res*. 2014; 2:735-745.
- [9] Jassim AM. Protective Effect of *Petroselinum crispum*(parsley)extract on histopathological changes in liver ,kidney and pancreas induced by Sodium Valproate-in male Rats kufa. *J Vet Med Sci*. 2013; 4:20-27.
- [10] Al-Rouby NM, Gawish SM. Histological study on the possible protective effect of *Nigella sativa* oil on experimentally induced hepatotoxicity in albino rats treated with sodium valproate. *Global Adv Res J Med Med Sci*. 2013; 2:90-99.
- [11] Al-Amoudi WM. Protective effects of fennel oil extract against sodium valproate-induced hepatorenal damage in albino rats. *Saudi J Biol Sci*. 2017; 24:915-924.

- [12] Mitchell C, Robin MA, Mayeut A, et al. Protection against hepatocyte mitochondrial dysfunction delays fibrosis progression in mice. *Am J Pathol.* 2009; 175:1929-1937.
- [13] Tang XH, Gao J, Fang F, et al. Hepatoprotection of oleanolic acid is related to its inhibition on mitochondrial permeability transition. *Am J Chin Med.* 2005; 33:627-637.
- [14] Zhang R, Kang KA, Piao MJ, et al. Butin reduces oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction via scavenging of reactive oxygen species. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48:922-927.
- [15] Lin CM, Chen CS, Chen CT, et al. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 294:167-172.
- [16] Nagao A, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience. Biosci Biotechnol Biochem.* 1999; 63:1787-1790.
- [17] Franco JL, Posser T, Missau F, et al. Structure-activity relationship of flavonoids derived from medicinal plants in preventing methylmercury-induced mitochondrial dysfunction. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010; 30:272-278.
- [18] Santos AC, Uyemura SA, Lopes JL, et al. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24:1455-1461.
- [19] Dorta DJ, Pigoso AA, Mingatto FE, et al. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chem Biol Interact.* 2005; 152:67-78.
- [20] Wided K, Hassiba R, Nadia BH, et al. Effect of a long term treatment by Algerian propolis flavonoids on mitochondrial antioxidant-prooxidant balance. *West Afr J Pharmacol Drug Res.* 2007; 22/23:16-26.
- [21] Zhang R, Lee IK, Piao MJ, et al. Butin (7,3',4'-trihydroxydihydroflavone) reduces oxidative stress-induced cell death via inhibition of the mitochondria-dependent apoptotic pathway. *Int J Mol Sci.* 2011; 12:3871-3887.
- [22] Morin D, Barthélémy S, Zini R, et al. Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Lett.* 2001; 495:131-136.
- [23] Lahouel M, Amedah S, Zellagui A, et al. The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti- and pro-oxidant effect and flavonoids concentration. *Thérapie.* 2006; 61:347-355.
- [24] Preston TJ, Abadi A, Wilson L, Singh G. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 49:45-61.

- [25] Salvi M, Brunati AM, Clari G, Toninello A. Interaction of genistein with the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1556:187-196.
- [26] Ligeret H, Barthelemy S, Zini R, et al. Effect of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. *Free Radic Biol Med*. 2004; 36: 919-929.
- [27] Elingold I, Isollabella MP, Casanova MB, et al. Mitochondrial toxicity and antioxidant activity of a prenylated flavonoid isolated from *Dalea elegans*. *Chem Biol Interact*. 2008; 171:294-305.
- [28] Sakagami H, Jiang Y, Kusama K, et al. Induction of apoptosis by flavones, flavonols (3-hydroxyflavones) and isoprenoid-substituted flavonoids in human oral tumor cell lines. *Anti-cancer Res*. 2000; 20:271-277.
- [29] Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kappaB in cancer cells versus normal cells. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 376:338-346.
- [30] El-Deib KM, Nermien ZA. Comparison of the effects of some essential oils as antiinflammatory agents on the activities of lysosomal acid-hydrolases in rat liver in-vitro. *Nat Sci*. 2011; 9:90-98.
- [31] Zhang J, Wang J, Xu J, et al. Curcumin targets the TFEB-lysosome pathway for induction of autophagy. *Oncotarget*. 2016; 7:75659-75671.
- [32] Roy SJ, Stanely Mainzen Prince P. Protective effects of sinapic acid on lysosomal dysfunction in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50:3984-3989.
- [33] Punithavathi VR, Prince PS. Pretreatment with a combination of quercetin and alphatocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. *Life Sci*. 2010; 86:178-184.
- [34] Stanely Mainzen Prince P, Priya S. Preventive effects of rutin on lysosomal enzymes in isoproterenol induced cardio toxic rats: biochemical, histological and in vitro evidences. *Eur J Pharmacol*. 2010; 649:229-235.
- [35] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med*. 1996; 20:933-956.
- [36] Rarichandran LV, Puvanakrishman R, Joseph KT. Alterations in the heart lysosomal stability in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Biochem Int*. 1990; 22:387-396.

- [37] Salas-Salvado J, Fernandez-Ballart J, Ros E et al. Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Arch Intern Med.* 2008; 168:2449-2458.
- [38] Karlsen A, Retterstol L, Laake P et al. Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of proinflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr.* 2007; 137:1951-1954.
- [39] Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B et al. Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita.* 2007; 43:394-405.
- [40] Pierini R, Gee JM, Belshaw NJ, Johnson IT. Flavonoids and intestinal cancers. *Br J Nutr.* 2008; 99:53-59.
- [41] Scrophulariaceae : la famille de la Digitale <http://www.botanique.org/1/classification-549/description-diffrents-taxons/descriptionsfamilles/scrophulariaceae-famille-digitale/>
- [42] Ismael Elias S, Castro Souza V, Appezzato-da-Glória B. Anatomical confirmation of root parasitism in Brazilian *Agalinis* Raf. Species (Scrophulariaceae). *Braz Arch Biol Techn.* 2001; 44:303-311.
- [43] Cheriet T, Mancini I, Seghiri R, Benayache F, Benayache S. Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae). *Nat Prod Res.* 2015; 29:1589-1613.
- [44] Valdés B, Talavera S, Fernandez-Galiano E. Flora vascular de Andalucía Occidental (Scrophulariaceae). *Barcelona Ketres.* 1987; 2:486-547.
- [45] Handjjeva NV, Ilieva EI, Spassov SL, Popov SS. Iridoid glycosides from *Linaria* species. *Tetrahedron.* 1993; 49:9261-9266.
- [46] Quezel P, Santa S, Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol II. Edition C.N.R.S: Paris, 1963; 844.
- [47] Boukef MK, Médecine traditionnelle et pharmacopée : Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Agence de coopération culturelle et technique. 1 vol. Paris, ACCT, 1986; 350.
- [48] Stojanov N. In Our Medicinal Plants. Part II. Naukai Iskustvo, Sofia. 1973; 99.
- [49] Jiangsu College of New Medicine, A Dictionary of the Traditional Chinese Medicines. People's Hygiene Publisher. Beijing. 1977.
- [50] Otsuka H. Phenylethanoids from *Linaria japonica*. *Phytochemistry.* 1993; 32:979-981.

- [51] Kitagawa I, Tani T, Akita K, Yosioka I. On the constituents of *Linaria japonica* Miq. I: The structure of Linarioside a new chlorinated iridoid glucoside and identification of two related glucosides. *Chem Pharm Bull.* 1973; 21:1978-1987.
- [52] San Feliciano A, Gordaliza M, Miguel Del Corral JM, De La Puente ML. Neo-clerodane diterpenoids from roots of *Linaria saxatilis* var. *glutinosa*. *Phytochemistry.* 1993; 33:631-633.
- [53] Pahlow M. *El gran libro de las plantas medicinales* 4th Edn: Everest S. A. Madrid. 1979; 273.
- [54] Ercil D, Sakar MK, Del Olmo E, San Feliciano A. Chemical constituents of *Linaria aucheri*. *Turkish J Chem.* 2004; 28:133-139.
- [55] Kouichi M, Takashi T, Isao K, et al. New iridoid diesters of glucopyranose from *Linaria canadensis* (L.) Dum. *J Nat Med.* 2011; 65:172-175.
- [56] Otsuka H. Isolation of isolinariins A and B, new flavonoid glycosides from *Linaria japonica*. *J Nat Prod.* 1992; 55:1252-1255.
- [57] Otsuka H. Linarionosides A-C and acyclic monoterpene diglucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry.* 1994; 37:461-465.
- [58] Gordaliza M, Miguel del Corral JM, Mahiques MM, et al. Neo-clerodane diterpenoids from roots of *Linaria saxatilis* var. *saxatilis*. *Phytochemistry.* 1995; 40:1307-1309.
- [59] Hua H, Li X, Zhang H. Steroids from *Linaria vulgaris* Mill. *J Shenyang Pharmaceutical University.* 2000; 17:40-42.
- [60] Hua H, Piao F, Wang S, X. et al. Study on a new alkaloid of *Linaria vulgaris*. *J Shenyang Pharmaceutical University.* 1997; 14:219-220.
- [61] Bahar A, Al-Rehaily AJ, Al-Howiriny TA, et al. Scopolioside-D2 and harpagoside-B: Two new iridoid glycosides from *Scrophularia deserti* and their antidiabetic and anti-inflammatory activity. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26:462-467.
- [62] Gordaliza M, Del Corral Jose MM, de la Puente ML, et al. Cytotoxic activity of neo-clerodane diterpenoids. *Bioorg Med Chem Lett.* 1997; 7:1649-1654.
- [63] Tundis R, Deguin B, Loizzo MR, et al. Potential antitumor agents: flavones and their derivatives from *Linaria reflexa* Desf. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15:4757-4760.
- [64] Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, et al. Acetyl-cholinesterase inhibition by extracts and isolated flavones from *Linaria reflexa* Desf. (*Scrophulariaceae*). *Nat Prod Commun.* 2007; 2:759-763.

- [65] Gonuz A, Dujger B, Kargioglu M. The morphological, anatomical properties and antimicrobial activity of endemic *Linaria corifolia* Desf. (Scrophulariaceae) in Turkey. *Pakistan J Biol Sci.* 2005; 8:220-226.
- [66] Akkol EK, Ercil D. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of some *Linaria* species from Turkey. *Pharmac Biol.* 2009; 47:188-194.
- [67] Vrchovska V, Spilkova J, Valentao P, et al. Assessing the antioxidative properties and chemical composition of *Linaria vulgaris* infusion. *Nat Prod Res.* 2008; 22:735-746.
- [68] Aydogdu I, Zihnioglu F, Karayildirim T, et al. α -Glucosidase inhibitory constituents of *Linaria kurdica* subsp. *ericalyx*. *Nat Prod Commun.* 2010; 5:841-844.
- [69] Bianco A, Guiso M, Ballero M, et al. Iridoids in the flora of Italy: glycosidic monoterpenes from *Linaria capraria*. *Nat Prod Res.* 2004; 18:241-246.
- [70] Kitagawa I, Yoshihara M, Kamigauchi T. Linarienone, a new cis-clerodane-type diterpene from the subterranean part of *Linaria japonica* Miq. *Tetrahedron Lett.* 1977; 14:1221-1224.
- [71] Kitagawa I, Yoshihara M, Tani T, Yosioka I. Linaridial, a new cis-clerodane-type diterpene dialdehyde, from *Linaria japonica*. *Tetrahedron Lett.* 1975; 1:23-26.
- [72] Serafini M, Foddai S, Ballero M, et al. The occurrence of iridoid glycosides in *Cymbalaria* spp. in Italy. *Nat Prod Res.* 2004; 18:325-327.
- [73] Villasenor, I. M. Bioactivities of Iridoids. *Anti-Inflammatory Anti-Allergy Agents Med. Chem.* 2007, 6:307-314.
- [74] Strack D. In *Plant Biochemistry*, ed. Dey PM, Harborne JB, Academic Press, London, 1997; 387-416.
- [75] Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie.* 2004; 1:3-6.
- [76] Bruneton J. Acides phénols. In: *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 2008; 198-260.
- [77] Sokolowska-Wozniak A, Szewczyk K, Nowak R. Phenolic acids from the herb of *Linaria vulgaris* (L.) Mill. *Herba Pol.* 2003; 49:161-165.
- [78] Otsuka H. Iridoid glucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry.* 1993; 33:617-622.
- [79] Hua H, Li X, Xing SE, Pei YH. Chemical constituents of *Linaria vulgaris*. *Chin Pharm J* (Beijing, China). 2005; 40:653-656. Chinese.

-
- [80] Hassig A, Liang WX, Schwabl H, Stampfli K. Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Med Hypotheses*. 1999; 52:479-481.
- [81] Stoclet JC, Schini-Kerth V. Flavonoïdes alimentaires et santé humaine. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2011; 69:78-90.
- [82] Bruneton J. *Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales*. Paris, La Voisier TEC et DOC, 2ème édition. 1999; 268-277.
- [83] Harborne J B. (1993). *The flavonoids: advances in research since Chapman & Hall/CRC*, 1986. London.
- [84] Stöckigt J, Sheludko Y, Unger M, et al. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic- electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *J chromatogr A*. 2002; 967:85-113.
- [85] Harkiss KJ. Scrophulariaceae. VI. Quantitative determination of choline in *Antirrhinum majus*, *A. orontium*, and *Linaria vulgaris*. *Planta Med*. 1972; 21:353–357.

Deuxième Partie

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Chapitre 5

Matériels et méthodes

5.1 Matériel végétal et screening phytochimique

La plante *Linaria tingitana* a été récoltée en mois de mai 2009 du parc national d'El-Kala de la Wilaya de El-Taref, période correspondant à sa pleine floraison. Les échantillons sont lavés puis séchés à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant environ 10 jours. Devenus sèches, les échantillons sont récupérés dans des sacs propres pour servir ultérieurement à l'extraction. L'identification botanique a été réalisée avec le concours de monsieur le Dr. Sarri Djamel, département de Biologie, Université Mohamed Boudiaf de M'Sila (spécimen de référence N° 08/2009/CCN12).

5.1.1 Criblage phytochimique préliminaire

Les parties aériennes séchées de *L. tingitana* ont été soumises à un criblage phytochimique préliminaire pour identifier ses différents constituants chimiques actifs selon des méthodes phytochimiques standards décrites par Harbone [1] et khandelwal [2]. L'ensemble des ces produits comprend les alcaloïdes, la coumarine, les terpénoïdes, les triterpénoïdes, les stérols insaturés, les stérols saturés, les anthocyanes, les leucoanthocyanes, les flavonoïdes, les saponines et les tannins.

5.1.2 Préparation des extraits

Les parties aériennes (1285,15 g) ont été mises en macération à la température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (MeOH/H₂O 80/20) 4 fois pour une période de 72 heures. Le solvant a été évaporé à 38 °C et sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'extrait concentré. Dilué avec l'eau distillée (514 ml), cet extrait subit une extraction successive de type liquide-liquide, en utilisant des solvants de polarité croissante, en commençant par l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol (figure 5.1). Ce travail a été réalisé au niveau de l'Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Faculté des Science Exactes, Université des Frères Mentouri. La (Figure 5.1) récapitule les différentes étapes d'extraction réalisées.

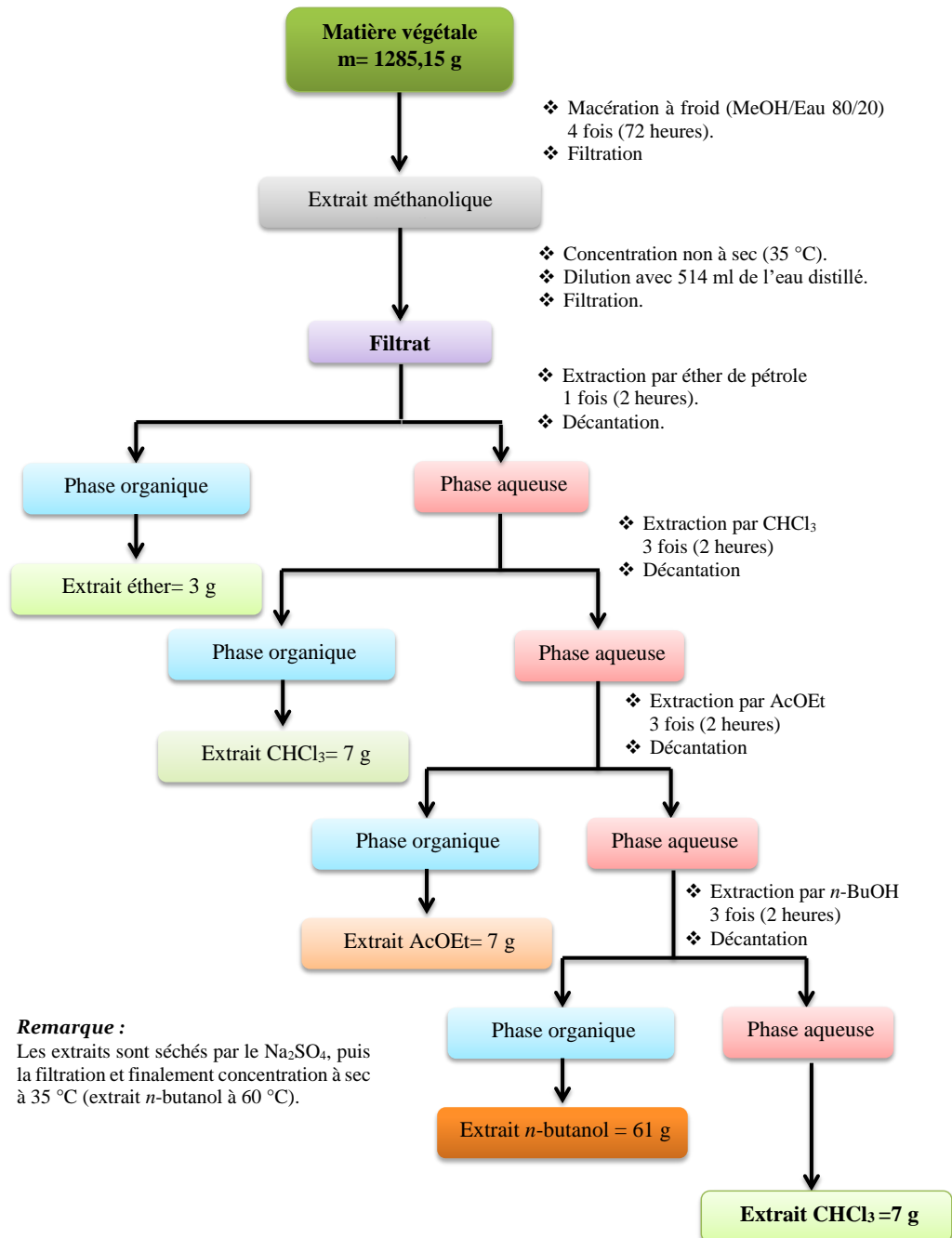
5.1.3 Dosage des polyphénols totaux

Afin de caractériser les trois phases d'extraits (chloroformique : CHCl₃, l'acétate : AcOEt et n-butanolique : *n*-BuOH) préparées à partir de l'espèce *L. tingitana*, un dosage des polyphénols totaux a été effectué.

Les polyphénols sont estimés par la méthode de Folin-Ciocalteu [3] en utilisant l'acide gallique (10-200 µg/ml) comme standard. Ce dosage repose sur la réduction en milieu alcalin du mélange phosphotungstique (WO₄²⁻) phosphomolybdique (MoO₄²⁻) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à λ=765 nm dont l'intensité de la couleur est proportionnelle au taux des composés phénoliques oxydés présents dans le milieu [4]. Les concentrations des polyphénols totaux sont extrapolées à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, les valeurs sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg GAE/g d'extrait).

5.1.4 Dosage des flavonoïdes

Le contenu des flavonoïdes est estimé en utilisant la méthode décrite par Bahorun et ses collaborateurs [5] en ajoutant le réactif trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à la solution contenant l'extrait. La coloration jaunâtre obtenue due à la formation d'un complexe entre le chlorure

Figure 5.1: Macération et extraction des parties aériennes de *Linaria tingitana* Boiss. & Reut.

d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes donnant une absorbance maximale à $\lambda=430$ nm. Le taux des flavonoïdes est déduit à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de la quercetin, les valeurs sont exprimées en mg équivalent de quercetin par g d'extrait (mg QE /g d'extrait).

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

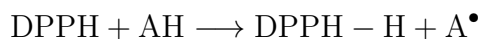
Le profil LC-MS a été réalisé sur Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) modèle 1100 séries de chromatographie liquide couplé à une matrice de détecteur photodiode (Agilent, Palo Alto, CA, USA) série 1100, et à un Esquire LC-ion piège spectromètre de masse (Bruker, Billerica, MA, USA) équipé par une ionisation électronébuliseur (ESI) d'interface. Le détecteur photodiode a été fixée à $\lambda=330$ nm. Le système d'élution est de 80:20 (H_2O + 1 ml d'acétate d'ammonium (10 mM): CH_3CN + 1 ml d'acétate d'ammonium (10 mM)) pendant 30 min puis il passe à 0:100 jusqu'à 56 min, le fractionnement de l'effluent de la colonne a été réalisé avec un débit de 1 ml/min s'écoulant dans le spectromètre de masse. Le spectre LC-MS a été exécuté sur une colonne de type Nucleosil C18 Macherey–Nagel (250 mm \times 4,6 mm de diamètre, diamètre de 5 μm , coiffe terminale). L'azote de haute pureté a été utilisé comme le nébuliseur et également en tant que gaz de séchage à 300 °C à une vitesse d'écoulement constante de 6 l/min. Les spectres complets ont été acquis en mode d'ions négatifs dans la région m/z 100-1000, en adoptant les paramètres suivants: unités d'entraînement de piège, 55,1; capillaire tension de sortie, -120,4 V; skimmer 1 tension, -43,3 V. Les expériences de fragmentation MS/MS ont été réalisées sur l'ion précurseur choisi. Les analyses des données (version 3,0, Bruker Daltonik GmbH) ont été utilisées pour élucider les spectres de masse. Pour l'étude du profil des iridoïdes de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* : une colonne de type C18 phenomenex Kinetex 5 μm 100A 250 mm \times 4,6 mm (00G-4601-E0) a été utilisée. Avec comme conditions: un débit de 1 ml/min, l'éluant: A = H_2O + 0,1% d'acide formique, B = CH_3OH + 0,1% d'acide formique. Gradient: A = 80% à 0% pendant 40 min. UV-DAD 200-700 nm; la chaîne UV: 204, 234, 254, 470 et 665 nm. La source ESI: mode positif et négatif; l'injection: 5 μl .

5.2 Screening biologique

5.2.1 Évaluation de l'activité antioxydante

5.2.1.1 Effet anti-radicalaire par le test au DPPH°

L'effet anti-radicalaire des extraits (CHCl₃, AcOEt et *n*-BuOH) de *L. tingitana* a été évalué *in vitro* par la méthode de DPPH° (2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle) décrite par Ohinishi et ses collaborateurs [6]. Le DPPH° (diphényle picryl-hydrazyle) est un radical libre de couleur violette qui devient jaune (diphényle picryl-hydrazine) quand il est réduit par un donneur de proton H⁺ [7].



L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [8].

Brièvement, 1 ml de différentes concentrations (0-600 µg/ml) de chaque extrait de *L. tingitana* a été ajouté à 1 ml de solution méthanol de DPPH° (0,2 mM). Après 30 min d'incubation dans l'obscurité et à la température ambiante, l'absorbance a été lue à λ=517 nm. La vitamine C et le Trolox ont été également utilisés comme référence. L'effet antioxydant des extraits est exprimé en pourcentage de réduction de DPPH° selon la formule suivante:

$$\% \text{ de réduction} = \frac{\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}} \times 100\%$$

Abs_{contrôle}: Absorbance du contrôle (contenant tous les réactifs excepté le composé d'essai).

Abs_{échantillon}: Absorbance de l'essai (échantillon ou standard).

5.2.1.2 Effet chélateur du fer ferreux

L'effet chélateur des extraits (CHCl₃, AcOEt et *n*-BuOH) de *L. tingitana* a été mesuré selon la méthode décrite par Dinis et ses collaborateurs [9]. La méthode est basée sur la capacité d'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine après incubation des échantillons avec les ions de (Fe²⁺).

Un volume de 1 ml de chaque solution d'extraits (0-600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ou du chélateur de référence l'EDTA (0-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a été initialement mélangés avec 50 μl de chlorure de fer (FeCl_2) (2 mM). 200 μl de Ferrozine (5 mM) ont été ajoutées au milieu réactionnel. Le mélange est bien agité puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la complexation du fer résiduel et la formation d'un chromophore rouge (Fe(II)-Ferozine) ayant un maximum d'absorption à $\lambda=562$ nm. L'effet séquestrant des échantillons vis-à-vis le fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Chélation} = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

A_c : Absorbance du contrôle.

A_t : Absorbance d'extrait testé ou chélateur de référence.

Dans la mesure de la disponibilité des extraits, les tests suivants ne sont effectués que sur la fraction n-butanolique (*n*-BuOH).

5.2.1.3 Test de blanchissement de β -carotène

Le test de blanchissement de la β -carotène a été réalisé en adoptant la méthode Krishnaiah et ses collaborateurs [10]. L'émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée par la dissolution de 0,5 mg de β -carotène dans 1 ml du chloroforme, 25 μl de l'acide linoléique et 200 mg de tween[®] 40. Après l'évaporation complète du chloroforme par rotavapeur à 40 °C. On ajoute 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène. A 2,5 ml de l'émulsion précédente on ajoute (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* ou d'antioxydant de référence (Trolox) préparé dans le méthanol. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence de l'extrait ou d'antioxydant de référence est suivie à $\lambda=490$ nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures. L'activité antioxydante relative (AAR) est calculée selon l'équation suivante:

$$\text{AAR} = \frac{\text{Abs}_{\text{échantillon}}}{\text{Abs}_{\text{standard}}} \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{standard}}$: Absorbance de l'échantillon après 48 heures.

$\text{Abs}_{\text{échantillon}}$: Absorbance du Trolox après 48 heures.

5.2.1.4 Pouvoir réducteur du Fer

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) a été déterminé selon la méthode rapportée par Oyaizu [11]. Le principe de la technique est basé sur la capacité à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en sel de fer ferreux (Fe^{2+}). La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}). L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait testé [11].

Un volume de 1 ml de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* à différentes concentrations (0-1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a été mélangé avec 1 ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à (1%). L'ensemble a été incubé au bain-marie à 50 °C pendant 20 min. Après refroidissement on ajoute 1 ml d'acide trichloracétique à (10%) pour arrêter la réaction puis on effectue une centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min. Un aliquote de 1,5 ml de surnageant a été combinée avec 1,5 ml d'eau distillée et 300 μl d'une solution aqueuse de FeCl_3 (0,1%). La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à $\lambda=700$ nm contre un blanc où l'extrait est substitué par de l'eau distillée dont le Trolox a été utilisé comme référence. Le pourcentage de pouvoir réducteur de fer est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Pouvoir réducteur de fer \%} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A_0 : est l'absorbance du blanc.

A_1 : est l'absorbance en présence de l'échantillon/référence.

5.2.1.5 Effet scavanger de l'oxyde nitrique (NO°)

L'effet scavanger du radical oxyde nitrique (NO) a été évalué selon la méthode de Sreejayan et Rao [12] basée sur la réaction de Griess. Le mélange réactionnel contenant 3 ml de nitropruside de sodium (0,2 M), 1 ml d'une solution saline du tampon phosphate (pH 7,4) et 1 ml de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* à concentrations variantes (50-1300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) est incubés à 25 °C pendant 2 heures. Après l'incubation, 0,5 ml de réactif de Griess (1% sulfanilamide, 0,1% naphthyl éthylène diaminedihydrochloride (NNED) dans 2% H_3PO_4) a été ajouté à 0,5 ml de mélange réactionnel puis incubés à l'abri de la lumière pendant 30 min.

L'absorbance du chromophore formé est mesurée à $\lambda=546$. Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivant:

$$I (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

A_0 : est l'absorbance de la solution du blanc (contrôle négatif de la réaction).

A_1 : est l'absorbance en présence de l'échantillon/standard (Trolox).

5.2.2 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

5.2.2.1 Inhibition de la dénaturation de l'albumine

L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* contre la dénaturation de l'albumine membranaire induite par la chaleur a été évalué *in vitro* selon la méthode décrite par Sakat et collaborateurs [13]. La mesure de la turbidité a été faite à $\lambda=660$ nm par spectrophotométrie et les résultats ont été comparés aux ceux du diclofénac, l'anti-inflammatoire non stéroïdien comme référence. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine est calculé selon la formule suivante:

$$(\%) \text{ Inhibition de la dénaturation} = 100 - \left[\frac{A_1}{A_0} \times 100 \right]$$

A_0 : est l'absorbance de l'échantillon/standard.

A_1 : est l'absorbance de la solution de contrôle.

5.2.2.2 Stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC)

Cette technique consiste à un dosage *in vitro* pour évaluer l'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* contre la lyse membranaire des globules rouges (HRBC) induite par l'hypotonie [14]. La teneur en hémoglobine dans la suspension a été estimée par spectrophotométrie à $\lambda=560$ nm. Le pourcentage de l'hémolyse produite en présence de l'eau distillée a été pris à 100%. La stabilisation ou la protection de la membrane des HRBC a été calculée par la formule suivante:

$$(\%) \text{ Stabilisation} = 100 - \left[\frac{A_1}{A_0} \times 100 \right]$$

A_0 : est l'absorbance de l'échantillon/standard (diclofénac).

A_1 : est l'absorbance de la solution de contrôle.

5.2.2.3 Induction de l'œdème dans la patte par la carragénine

L'expérience a été effectuée selon le protocole de Srivastava et ses collaborateurs [15]. L'étude a été réalisée sur des rats *Albinos wistar* provenant de l'élevage au niveau de l'animalerie de l'Université des Frères Mentouri Constantine. Les rats (200-220 g) sont regroupés par lot de cinq. Ils ont été mis à jeun 12 heures avant l'administration des produits et répartis en quatre groupes:

- **Groupe 1:** les rats témoins qui reçoivent par gavage l'eau physiologique.
- **Groupe 2:** les rats reçoivent oralement Diclofénac-sodique à une dose de (10 mg/kg) [15].
- **Groupe 3:** les rats reçoivent l'extrait *n*-BuOH de *L. tigitana* par gavage à une dose de (100 mg/kg).
- **Groupe 4:** les rats reçoivent l'extrait *n*-BuOH de *L. tigitana* par gavage à une dose de (200 mg/kg).

Une heure plus tard, l'inflammation chimique a été provoquée par l'injection de 0,1 ml de carragénine à (1%) dans une solution saline isotonique sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche des rats.

Détermination du volume de l'œdème de la patte

La progression du volume de l'œdème des pattes gauche de chaque rat a été mesuré une heure avant l'induction de l'œdème et (à 1, 2, 3, 4, et 24h) après l'injection de la carragénine en utilisant le vernier caliper numérique. L'œdème a été traduit par une augmentation en épaisseur des pattes (mm) due à la provocation inflammatoire. Pour chaque groupe traité, les diamètres moyens obtenus à ces différents relevés, extrait ou diclofénac, (D_t) ont été comparés à celui obtenu avant tout traitement (D_0), permettant ainsi de calculer les pourcentages d'œdème (pourcentage d'inflammation), à partir de la formule:

$$(\%) \text{ inflammation} = \frac{D_0 - A_t}{D_0} \times 100$$

Tandis que le pourcentage d'inhibition de l'œdème a été calculé selon la relation:

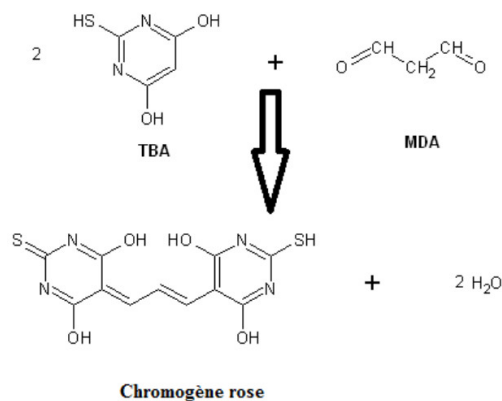
$$(\%) \text{ inhibition} = \frac{(D_t - D_0)_{\text{témoin}} - (D_t - D_0)_{\text{traité}}}{(D_t - D_0)_{\text{témoin}}} \times 100$$

5.2.2.3.1 Mesure de l'activité de myéloperoxydase (MPO)

L'accumulation des neutrophiles dans la patte des rats a été mesurée par l'évaluation de l'activité de la myéloperoxydase (MPO). Après 24 heures d'induction de l'inflammation les rats ont été sacrifiés par dislocation cervicale et les tissus des pattes derrières (50-100 mg) ont été recueillis et homogénéisés. L'activité de la MPO dans les homogénats des pattes a été évaluée par la mesure du changement d'absorption à $\lambda = 450$ nm en présence d'*o*-dianisidine dihydrochlorure et 0.006% de H_2O_2 selon le protocole de Posadas et ses collaborateurs [16]. L'activité MPO est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire ($1.13 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) de *o*-dianisidine oxydé. Les résultats sont exprimés en MPO U/mg de tissu dont l'unité (U) de l'activité MPO a été définie telle que la conversion de 1 μmol de H_2O_2 en eau dans 1 min à 25 °C [16].

5.2.2.3.2 Dosage de malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress oxydant. La réaction de dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100 °C) entre le MDA et deux molécules de thiobarbiturique acide (TBA) donnant un pigment de couleur rose ayant une absorbance maximale à $\lambda = 532$ nm selon cette réaction:



Le taux de MDA a été mesuré dans les homogénats des pattes des rats selon la méthode décrite par Ohkawa et ses collaborateurs [17]. L'absorption a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à $\lambda=532$ nm et les résultats sont exprimés en nmol par milligramme de tissu intra-plantaire (nmol/mg tissu) en utilisant le coefficient d'extinction molaire $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ [17].

5.2.2.3.3 Étude histologique

Les petits morceaux de la surface plantaire des pattes derrières ont été pris 24 heures suivant l'injection intra-plantaire de la carragénine et ils ont été mis dans le formaldéhyde 10% à pH 7,4 et stockés pour l'examen histologique. Les biopsies prises des pattes ont été inclus dans la paraffine, coupés (2 à 5 μm) puis subis une coloration avec l'hématoxyline- éosine.

5.2.2.4 Péritonite induite par la carragénine

La migration des neutrophiles vers la cavité péritonéale des rats a été mesurée selon la technique développée par Da Silva Guerra et ses collaborateurs [18]. Les rats *Albinos wistar* ont été répartis au hasard en quatre lots de cinq pour chacun qui reçoivent:

- **Groupe 1:** l'eau physiologique.
- **Groupe 2:** diclofénac à une dose de (10 mg/kg) [18].
- **Groupe 3:** l'extrait *n*-BuOH de *L. tigitana* par gavage à une dose de (100 mg/kg).
- **Groupe 4:** l'extrait *n*-BuOH de *L. tigitana* par gavage à une dose de (200 mg/kg).

Après 1 heure, une péritonite est induite chez les rats par une injection d'une solution de (1%) de carragénine par voie intra-péritonéale préparée dans une solution saline isotonique. Après 4 heures les rats ont été sacrifiés par dislocation cervicale et leurs cavités péritonéales ont été lavées avec 2 ml du PBS (pH=7,5), et le fluide péritonéal a été collecté dans des tubes contenant l'anticoagulant l'EDTA. Des aliquotes péritonéales ont été stockés à -80 °C pour la mesure des taux de (NO). La numération des leucocytes et des neutrophiles a été effectuées après coloration par la solution de Turk (0.2% colorant cristal violet dans 30% d'acide acétique). Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par millimètre de solution péritonéal [19].

Le pourcentage d'inhibition des leucocytes a été calculé selon la formule suivante:

$$(\%) \text{ inhibition} = \left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100$$

T: représente le nombre des leucocytes dans les groupes traités.

C: représente le nombre des leucocytes dans le groupe témoin.

5.2.2.4.1 Détermination du taux du (NO)

Pour déterminer le taux de production du (NO) la mesure de concentration de nitrate dans l'exsudat a été mesurée selon le protocole de conversion du nitrate grâce à la réaction de Griess [20]. L'absorbance a été mesurée à $\lambda=540$ nm et la teneur en nitrite a été calculée grâce à la courbe standard du nitrite de sodium et comparée avec la courbe standard préparée avec le NaNO_2 . Les résultats sont exprimés en μM de (NO).

5.3 Évaluation de l'activité antioxydante et hepatoprotective

5.3.1 Évaluation de la fonction hépatique

5.3.1.1 Animaux et protocole d'expérimentation

Les animaux utilisés dans cette expérimentation sont des rats males de souche *Albinos wistar* pesant entre 180 g et 315 g issus d'un élevage au niveau de l'animalerie de l'Université des Frères Mentouri Constantine. Ils sont placés aléatoirement dans des cages standard pour une période d'acclimatation (3 semaines) avant d'être utilisés dans les expériences. Pendant cette période les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture de type standard et ils sont maintenus dans une animalerie à température constante (22 ± 2) °C et soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h.

Induction de l'hépatotoxicité et traitement des rats

Pour induire une hépatotoxicité, les rats ont été traités par injection intrapéritonéale (IP) de l'acide valproïque (AVP) (Dépakine®) préparé dans l'eau physiologique (NaCl 0,9%).

Les rats sont répartis en quatre groupes:

- **Groupe 1:** 6 rats témoins qui reçoivent quotidiennement par gavage de l'eau physiologique (NaCl 0,9%) pendant 14 jours.
- **Groupe 2:** 12 rats traités par l'AVP à une dose (IP) de (400 mg/kg) [21] par jour pendant 14 jours.
- **Groupe 3:** 8 rats contrôle positif, reçoivent quotidiennement et simultanément la vitamine E (Vit E) par gavage à une dose de (200 mg/kg) [22] et l'AVP à une dose (IP) de (400 mg/kg) pendant 14 jours.
- **Groupe 4:** 9 rats qui reçoivent chaque jour et simultanément l'extrait *n*-BuOH de *L. tigitana* par gavage à une dose de (200 mg/kg) et l'AVP à une dose (IP) de (400 mg/kg) pendant 14 jours.

5.3.1.2 Marqueurs de l'hépatotoxicité

Le 15^{ème} jour, les rats ont été privés de la nourriture pendant 18 heures. Le sang a été prélevé au niveau du sinus rétro-orbital de l'œil (région cartilagineuse richement vascularisée) à l'aide d'un capillaire à hématocrite contenant des substances anticoagulantes. Après prélèvement, le sang total est recueilli dans des tubes héparinés (5 ml) numérotés et centrifugés à 4000 tours/min pendant 15 min. Le plasma a été récupéré dans des tubes Eppendorf est conservé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour les dosages biochimiques.

Le dosage de ces différents biomarqueurs de la fonction hépatique a été réalisé par colorimétrie en utilisant des Kits du commerce sur un automate multiparamétrique dans un laboratoire de biologie et d'analyses médicales.

Dosage des transaminases

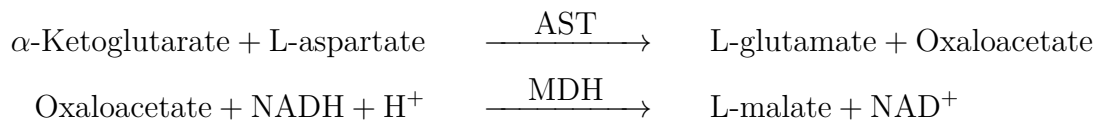
Les transaminases (ou amino transférases) sont des enzymes hépatocytaires dont la fonction est de catalyser des réactions de transfert d'un groupe aminé d'un acide α -aminé à un acide α -cétonique. Il existe deux transaminases dont le coenzyme est la vitamine B6 (phosphate de pyridoxal) ALT et AST.

Le principe de dosage des transaminases dans le sérum est réalisé selon les réactions suivantes:

Pour l'ALT:



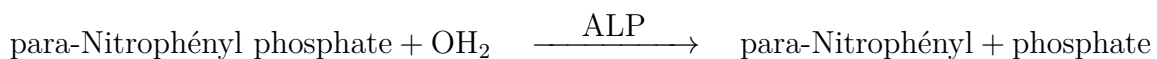
Pour l'AST:



Les dosages ont été faits avec un analyseur, le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'enzyme et les valeurs sont exprimées en (U/l).

Dosage de la phosphatase alcaline (ALP)

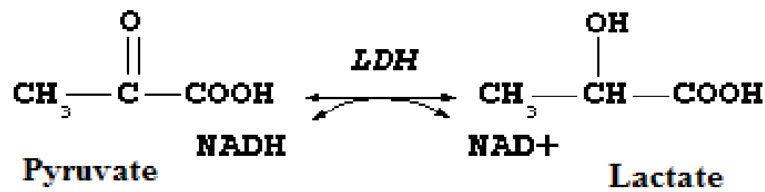
Les phosphatases alcalines (ALP) sont des enzymes présentes partout dans l'organisme mais surtout dans le foie, l'os, l'intestin et les reins. L'élévation de ce biomarqueur traduit une atteinte cholestatique caractérisée par la libération de l'enzyme du tissu hépatocytaire vers le compartiment plasmatique. En milieu alcalin, l'ALP catalyse l'hydrolyse du para-Nitrophényl phosphate en para-Nitrophénol selon la réaction suivante:



L'évaluation de la concentration plasmatique de l'ALP a été réalisée avec un analyseur en mesurant de manière photométrique la vitesse d'apparition du para-Nitrophénol, qui est proportionnelle à l'activité de l'ALP et les valeurs sont exprimées en (UI/l)

Dosage de lactate déshydrogénase (LDH)

Les lactates déshydrogénases (LDH) (déshydrogénases lactiques) sont des enzymes cytoplasmiques présentes dans tous les tissus et catalysant la transformation réversible du lactate-pyruvate.



Elle est facilement libérée dans le plasma lors d'une lésion tissulaire. Une augmentation importante du taux de LDH est un signe d'une souffrance cellulaire. La mesure de la concentration sérique de la LDH a été réalisée avec un analyseur par des méthodes en spectrophotométries. Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité LDH dans l'échantillon et les valeurs sont exprimées en (UI/l).

Dosage de la bilirubine totale

La bilirubine est le produit de dégradation de l'hémoglobine qui est considéré comme un marqueur de l'atteinte cholestatique. Après avoir circulé dans le flux sanguin, la bilirubine parvient au foie où elle est excrétée dans le canal biliaire et stockée dans la vésicule biliaire. Finalement, la bilirubine est rejetée dans l'intestin grêle sous forme de bile pour contribuer à la digestion des graisses, avant d'être excrétée dans les selles.

En présence de diméthylsulfoxyde (DMSO), la bilirubine se couple avec l'acide sulfanique diazoté pour donner l'azobilirubine. L'absorbance de l'azobilirubine ainsi produite est proportionnelle à la concentration en bilirubine. Les mesures ont été faites à l'aide d'un analyseur et les valeurs sont exprimées en (mg/l).

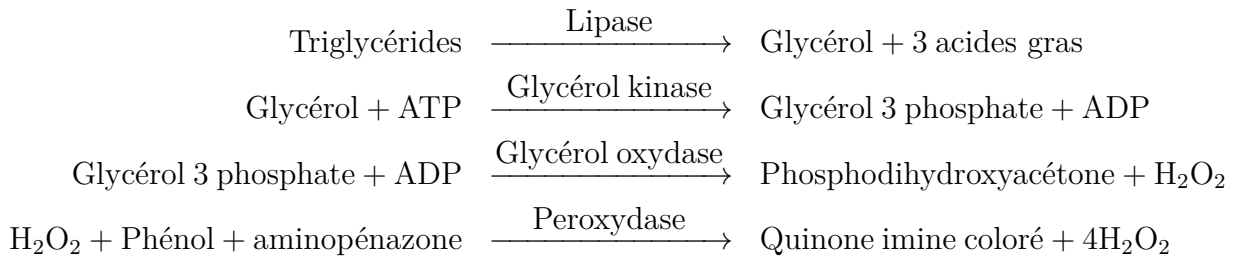
5.3.1.3 Évaluation de lipidogramme et stéatose hépatique

Dosage des triglycérides (TG)

Le dosage des triglycérides a été effectué par l'autoanalyseur de type (ARCHITECT c Systems) par méthode enzymatique colorimétrique des triglycérides en utilisant le Kit de réactif des glycérides.

Le principe repose sur le dosage enzymatique du glycérol libre après action de la lipase. Les triglycérides sont hydrolysés enzymatiquement par la lipase afin de libérer les AG et le glycérol. Ce dernier est phosphorylé par l'ATP et le glycérol Kinase pour produire du Glycérol-3-phosphate et de l'ADP. Le Glycérol-3-phosphate est oxydé en dihydroxyacétone phosphate par

le glycérol phosphate oxydase en produisant le (H_2O_2). Lors d'une réaction colorée catalysée par la peroxydase, le (H_2O_2) réagit avec le 4-aminoantipyrine (4-AAP) et le 4-chlorophénol (4-CP) pour produire un colorant rouge selon les réactions suivantes:



L'intensité de la couleur de la quinone imine mesuré à $\lambda=505$ nm est directement proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon du sérum en (mg/dl).

Dosage de cholestérol-HDL

Le cholestérol-HDL est une lipoprotéine dite de haute densité. Dans la mesure où il intervient dans l'élimination du cholestérol, il est aussi appelé "bon cholestérol". Il est véhiculé vers le foie pour être métabolisé et excrété sous forme de sels biliaires.

Après avoir précipité par l'acide phosphotungstique, en présence d'ions magnésium, les chylomicrons et les lipoprotéines de faible densité (LDL) et de très faible densité (VLDL) contenus dans le sérum. Le surnageant obtenu après centrifugation contient le HDL dont le cholestérol est dosé par le réactif cholestérol total enzymatique et les valeurs sont exprimées en (mg/dl).

Dosage de cholestérol-LDL

Les lipoprotéines de faible densité (LDL), sont synthétisées dans le foie sous l'action de différentes enzymes lipolytiques sur les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) riches en triglycérides. Le taux de cholestérol-LDL a été mesuré par méthode directe avec un kit enzymatique sélectif et les valeurs sont exprimées en (mg/dl). Le taux du cholestérol-LDL est, peut aussi, calculé à partir des triglycérides (TG), du cholestérol-HDL et du cholestérol total selon la formule de Friedewald :

$$\text{LDL (en mg/dl)} = \text{Cholestérol total} - \text{HDL} - (\text{Triglycérides}/5)$$

Dosage des lipides totaux

La mesure de la concentration sérique des lipides totaux a été réalisée avec un analyseur par des méthodes en spectrophotométries en utilisant le Kit de réactif des lipides totaux et les valeurs sont exprimées en (mg/dl).

Quantification des triglycérides au niveau du foie

La teneur en triglycérides dans le tissu hépatique a été déterminée suivant la technique de Folch et ses collaborateurs [23]. Celui-ci propose une extraction des lipides du foie (0,5 g) par un mélange de solvants polaire/apolaire (chloroforme/méthanol). Le chloroforme permet une dissolution totale des lipides et le méthanol la précipitation des protéines libérées. Après avoir les filtrats des lipides la mesure de la teneur en triglycérides hépatiques a été faite avec le Kit de réactif des triglycérides. Les résultats sont exprimés en mg des triglycérides par g de tissu hépatique (mg/g tissu).

5.3.1.4 Évaluation du statut oxydant cytosolique

Préparation des fractions hépatiques

Après le sacrifice des rats, les foies sont immédiatement prélevés et perfusés avec une solution saline froide (0,9%) afin de drainer tout le sang restant dans les tussus puis ils sont préparés en trois fractions dont l'une est destinée pour l'évaluation biochimique du statut oxydatif dans le cytosol, la deuxième pour les dosages concernant les mitochondries et la troisième pour l'étude de la fonction lysosomale. Toutes les fractions sont conservée à -80°C pour les analyses ultérieures.

Préparation de la fraction cytosolique

Le tissu hépatique a été bien lavé avec le NaCl (0,9%) et coupé en petits morceaux, pesés et homogénéisés (pour 1 g du foie 9 ml de solution tampon phosphate (0,1 M pH=7,4) contenant KCl (1,15%). Ensuite, l'homogénat a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min à 4°C et le surnageant récupéré a été subi une centrifugation à 9600 rpm pendant 45 minutes à 4°C . Le dernier surnageant (fraction cytosolique) récupéré est utilisé pour le dosage des marqueurs du stress oxydant.

5.3.1.4.1 La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique a été évaluée en dosant le taux de MDA selon la méthode d'Ohkawa et ses collaborateurs [17] décrite auparavant. Les résultats sont exprimés en nmol par gramme de foie (nmol/g tissu).

5.3.1.4.2 Dosage de la catalase (CAT) cytosolique

L'activité de la catalase cytosolique a été déterminée selon la méthode d'Aebi [24]. Le principe repose sur la disparition de H_2O_2 à 25 °C en présence de source enzymatique dans la fraction cytosolique selon la réaction suivante:



La quantité de H_2O_2 décomposé est directement proportionnelle à la concentration en substrat et la concentration en enzyme. L'absorbance est lue à $\lambda=240$ nm chaque minute dans un intervalle de temps de 2 min et l'activité de l'enzyme est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire : $0,043 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$. Les résultats sont exprimés en U/mg de protéine hépatique (U: μmol de H_2O_2 consommé par minute par mg de protéines.)

5.3.1.4.3 Dosage de la superoxyde dismutase (SOD) cytosolique

L'activité enzymatique de SOD cytosolique a été déterminée selon la méthode de Flohe [25]. Le principe repose sur la capacité d'inhibition de l'autooxydation du pyrogallol par la SOD. L'activité de l'enzyme est exprimée en U/mg de protéine du tissu hépatique (U/mg tissu). Une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'enzyme qui causerait l'inhibition de (50%) de l'autooxydation du pyrogallol. L'activité de l'enzyme est calculée selon l'équation suivante:

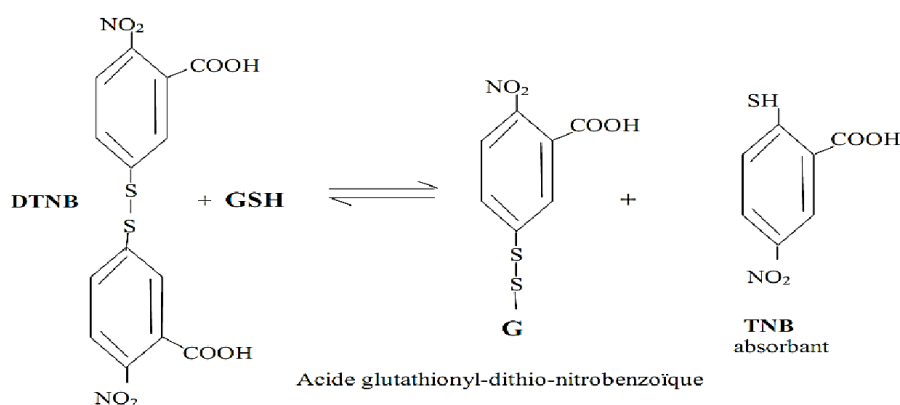
$$\text{Inhibition totale} = \frac{\text{Densité optique du blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon}}{\text{Densité optique du blanc}} \times 100$$

$$\text{U de SOD/mg de protéine} = \frac{\text{Inhibition totale}}{n \times 50}$$

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

5.3.1.4.4 Dosage du glutathion réduit (GSH) cytosolique

Le glutathion est le thiol intracellulaire le plus abondant dans toutes les cellules animales, il se trouve dans la cellule sous deux formes : une forme oxydée « GSSG » et une forme réduite « GSH » représentant plus de (99%) de la quantité total. Le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode d'Ellman [26]. Le principe consiste à scinder la molécule d'acide 5,5'dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH et la libération de l'acide thionitrobenzoïque (TNB). Ce dernier, à pH (8-9), présente une absorbance maximale à $\lambda=412$ nm selon la réaction suivante:



Les résultats sont déduits en se basant sur un coefficient d'extinction molaire de GSH: $13100 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Les concentrations exprimées en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine hépatique ($\mu\text{g}/\text{mg}$ prot).

5.3.1.4.5 Dosage du glutathion réductase (GR) cytosolique

L'activité du glutathion réductase (GR) a été mesurée selon la méthode de Coballase-Urrutia et ses collaborateurs [27]. Le principe du dosage est basé sur la réduction du GSSG en GSH par le NADPH en présence de GR. L'activité est mesurée en suivant la diminution de l'absorbance de la NADPH à $\lambda=340$ nm.



L'activité de l'enzyme est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de NADPH: $6.25 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Les résultats sont exprimées en U/mg de protéine hépatique (U : μmol NADPH oxydé/min).

5.3.1.4.6 Dosage du glutathion-S-transférase (GST) cytosolique

Le dosage de l'activité du glutathion-S-transférase (GST) cytosolique a été réalisé selon la méthode de Seyyedi et ses collaborateurs [28]. Les GST catalysent la réaction de conjugaison entre le glutathion et le 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) comme substrat. La conjugaison se fait par le biais du groupement thiol du glutathion selon la réaction suivante:



L'augmentation de l'absorption est directement proportionnelle à l'activité GST de l'échantillon. Cette dernière est déterminée classiquement par la mesure du produit (GS-DNB) à $\lambda=340$ nm issu de la réaction de conjugaison du CDBN avec le glutathion réduit. Les résultats sont déduits en utilisant un coefficient d'extinction molaire de CDBN: $9,6\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ et exprimés en U/mg de protéine de foie (U: μmol de conjugué CDBN formé/min).

5.3.1.4.7 Dosage du glutathion peroxydase (GPx) cytosolique

Le dosage de GPx est basé sur la méthode utilisée par Rotruck et ses collaborateurs [29]. Le GPx de l'homogénat tissulaire oxyde le glutathion et simultanément le H_2O_2 est réduit en H_2O . La quantité du glutathion restante réagit avec la solution DTNB pour donner un composé coloré qui est mesuré par spectrophotométrie à $\lambda=420$ nm. L'activité de GPx est exprimées en U/mg protéine de foie (U: μmol de GSH oxydé/min).

5.3.1.5 Étude histologique

Des petits morceaux des foies des rats ont été pris et mis dans le formaldéhyde 10% à pH=7,4, puis stockés pour l'examen histologique. Ils ont été inclus dans la paraffine, coupés ($5\mu\text{m}$) et subis une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (x 400).

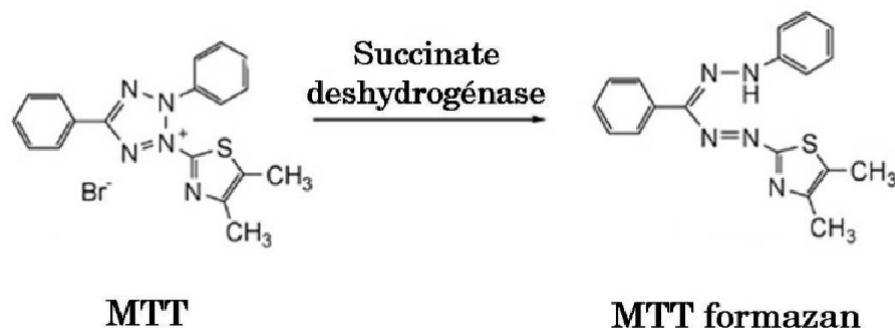
5.3.2 Évaluation de l'effet des iridoïdes sur la lignée cellulaire HepG2 traitée par l'AVP

La ligne HepG2 a été obtenue à partir d'un hépatocarcinome humain (ATCC® HB- 8065™) provenant du laboratoire du professeur Jean-Michel Pawlotsky (Inserm U955-Equipe 18 : Virolo-

gie Moléculaire et Immunologie-Physiopathologie et thérapeutique des hépatites virales chroniques, Henri Mondor-Faculté de Médecine de Créteil, Paris-Est). Les cellules ont été cultivées en milieu DMEM supplémenté avec (10%) de SVF, (1%) de glutamine, (100 U/ml) de pénicilline, (100 $\mu\text{g/ml}$) de streptomycine et (0,25 $\mu\text{g/ml}$) d'amphotéricine B (Thermofisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) dans des flasks de 75 cm^2 et ont été utilisées pour expériences lorsqu'elles atteignaient environ (80%) de confluence.

5.3.2.1 Mesure de la viabilité cellulaire (MTT)

C'est un test rapide et simple de numérotation des cellules vivantes, très utilisée dans les études de cytotoxicité permettant la détection colorimétrique de l'activité mitochondriale selon la méthode décrite par Edmondson et ses collaborateurs [30]. Il est basé sur la réduction par l'enzyme succinate déshydrogénase mitochondriale du «3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT)» en un précipité «formazan», réduction qui n'intervient que dans les cellules métaboliquement actives. L'addition d'une solution du DMSO dissout ces cristaux donnant une solution homogène :



Les cellules HepG2 ont été incubées dans un milieu de croissance normale (DMEM) en présence de concentrations croissantes d'AVP (0,1 - 0,3 - 1 - 3 - 10 et 30 mM) pendant 72 heures à 37 °C en atmosphère humide contenant (5%) de CO_2 . Après cette incubation, le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en présence d'une solution de MTT (1 mg/ml) pendant 1 heure. Le milieu a ensuite été retiré et les précipités de formazan ont été solubilisés avec le DMSO. Enfin l'absorbance a été mesurée à $\lambda=550$ nm, ce qui permet ensuite d'évaluer la quantité de cellules vivantes, grâce au calcul suivant :

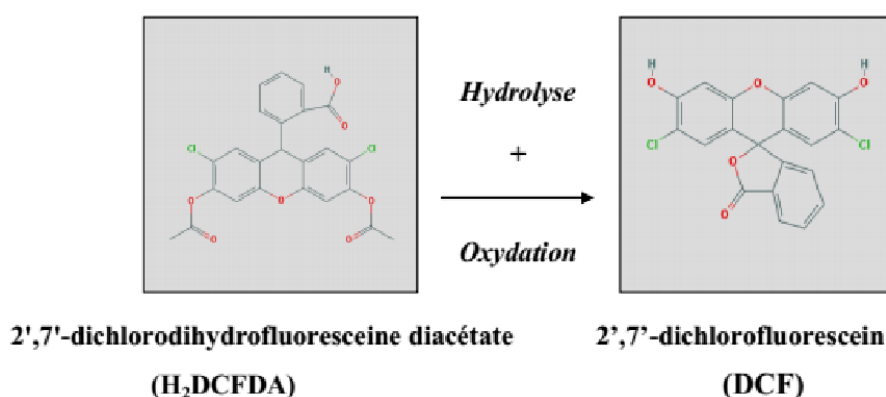
$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = 100 \times \frac{\text{moyenne absorbance des cellules traitées}}{\text{moyenne absorbance du témoin}}$$

L'activité succinate déshydrogénase est déterminée par rapport à celle des cellules témoins.

La mesure de la viabilité cellulaire nous a permis de sélectionner la concentration de 10 mM pour la suite des expériences dans lesquelles les cellules ont été incubées avec l'AVP 72 heures en présence des molécules (B9-4-6-1 : 6-O-seneciolyantirrhinoside + 6-O-angeloylantirrhinoside et B9-6-1B-6-4 : antirrhide) extraites de la phase *n*-BuOH de *L. tingitana* à différentes concentrations (3 - 10 - 30 - 100 et 300 μ M) afin de déterminer leur effet protecteur.

5.3.2.2 Mesure de la production des espèces réactives de l'oxygène

Les variations intracellulaires en concentration de la concentration de H_2O_2 ont été mesurées à l'aide d'une sonde redox, le carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacétate (carboxy- H_2 DCFDA, 50 mM dans le DMSO) (Thermofisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) suivant le protocole décrit par Wu et Yotnda [31]. L' H_2 DCFDA a la caractéristique de pénétrer dans les cellules et de s'accumuler dans le cytosol, puis déacétylée par une estérase en dichlorofluorescéine (DCF) comme suit :



Ce produit non fluorescent réagit ensuite avec le H_2O_2 pour former la dichlorofluorescéine dés-estérifiée (H_2 DCF) qui fluoresce à $\lambda=535$ nm quand elle est excitée à $\lambda=485$ nm.

Afin d'étudier la capacité de l'AVP à induire une production d'ERO les cellules ont été incubées avec l'AVP 72 heures à concentrations croissantes (0,1 - 0,3 - 1 - 3 - 10 et 30 mM), puis elles ont été reprises dans 1 ml de PBS ou de milieu de culture avec 10 μ M de H_2 DCFDA puis incubées 30 min à 37 °C à l'abri de la lumière. Les cellules ont ensuite été analysées extemporanément par cytométrie en flux sur un cytomètre Galaxy (Partec) en collectant la fluorescence verte avec un filtre passe-bande ($\lambda=550\pm 20$ nm) en prenant en compte 10 000

cellules sur une échelle logarithmique de fluorescence. Un contrôle a été utilisé en traitant avec le H_2O_2 (0,1 - 0,3 et 1 mM). Les données ont été analysées avec les logiciels Flomax et FlowJo.

Après avoir déterminée la capacité de l'AVP à induire une production d'ERO des mesures identiques ont été répétées à une concentration de 10 mM d'AVP en présence des molécules (B9-4-6-1 et B9-6-1B-6-4) à différentes concentrations (3 - 10 - 30 - 100 et 300 μM) afin d'évaluer l'effet protecteur de ces molécules.

5.4 Évaluation du dysfonctionnement mitochondrial

5.4.1 Étude *in vitro* sur des mitochondries hépatiques isolées

Cette étude vise à évaluer l'effet toxique de l'AVP sur la fonction mitochondriale hépatiques *in vitro*.

5.4.1.1 Isolement des mitochondries du foie

L'isolement des mitochondries du foie repose sur le fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle suivant le protocole décrit par [32].

Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale et le foie a été immédiatement prélevé et rincé dans du NaCl (0,9%) à 4 °C. La partie de l'organe réservée à l'isolement des mitochondries est pesée, finement hachée à l'aide de ciseaux puis placée dans un tube contenant le tampon de reprise (saccharose 70 mM, HEPES 10 mM, mannitol 220 mM, EGTA 4 mM, pH=7,4 à 4 °C, 10 ml par 1 g foie). La préparation est ensuite homogénéisée par des allers-retours du piston d'un Potter-Elvehjem motorisé (1500 tours/min) puis centrifugé à 3000 x g pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant est prélevé puis subit une centrifugation à 10000 x g pendant 10 min à 4 °C. Le culot contenant les mitochondries est repris et remis en suspension dans 1500 μl de tampon de respiration (saccharose 50 mM, HEPES 10 mM, KCl 100 mM, KH_2PO_4 5 mM, pH=7,4) au moyen d'un potter manuel par un simple aller/retour du piston. Les concentrations protéiques des préparations mitochondriales déterminées par une méthode turbidimétrique corrélée à la méthode de Lowry [33] étaient de l'ordre de (25-40 mg/ml).

Une partie de chaque préparation mitochondriale a été récupéré dans des tubes de 50 μl et mise à -20 °C pour l'étude de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

5.4.1.2 Mesure de la consommation d'oxygène

La consommation d'oxygène est mesurée par polarographie grâce à un oxygraphe, consistant en une chambre fermée, thermostatée et agitée, munie d'une électrode de Clark, sensible à l'oxygène, qui mesure la quantité d'oxygène présente dans le milieu [32].

L'oxygraphie

L'électrode de Clark (Microcathode Oxygen Electrode, Strathkelvin[®]) est composée d'une cathode en platine polarisée à -0,7 Volts et d'une anode en argent au contact d'une solution saturée de KCl. Elle est séparée du milieu à mesurer par une membrane en téflon perméable à l'oxygène. L'appareil est relié à un ordinateur permettant de visualiser la concentration d'oxygène (nmol/ml) en fonction du temps (minutes). Dans ces conditions l'oxygène présent dans la cuve de mesure diffuse à travers la membrane et est réduit au niveau de la cathode, créant une différence de potentiel proportionnelle à la quantité d'oxygène présente dans le milieu (Figure 5.2). Il est donc possible de mesurer directement la vitesse de respiration mitochondriale dans différentes conditions expérimentales.

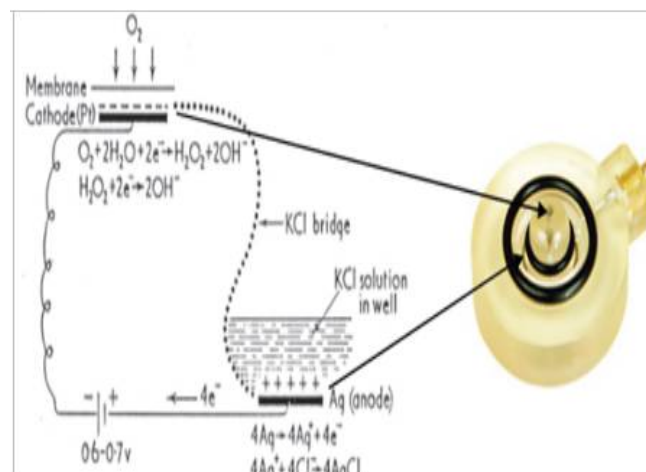


Figure 5.2: Schéma de principe de l'électrode de Clark.

Les mesures ont été effectuées dans une cuve thermostatée à 30 °C dans un volume total de 500 μ L contenant les mitochondries (1 mg/ml) préincuber avec l'AVP à différentes concentrations (1, 3 et 10 mM) pendant 30 min et du tampon de respiration sous agitation constante : dans ces conditions il n'y a pas de consommation d'oxygène (stade 1). La respiration est activée par l'ajout de différentes combinaisons de substrats et d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire :

- des substrats glucidiques: du succinate (10 mM) en présence de roténone (1 μM), du glutamate/malate (10 mM /5 mM) ou du pyruvate (10 mM).
- un substrat lipidique : le palmitoyl-carnitine (10 mM) en présence de malate (2 mM).

Ceci permet d'obtenir la vitesse de consommation de l'oxygène dépendante du substrat c'est-à-dire la respiration de base (ou stade 2). L'addition d'ADP (0.2 mM) dans la cuve induit la synthèse d'ATP au niveau du complexe V ce qui engendre l'accélération de la consommation d'oxygène (stade 3). Après consommation totale de l'ADP, la consommation d'oxygène diminue et revient à un niveau similaire à celui de la respiration de base (stade 4).

A chaque stade correspond une vitesse de consommation de l'oxygène exprimé en nano moles d'oxygène par minute et par mg de protéine (nmol/min/mg prot). Ces vitesses sont appelées, V2, V3 et V4 en fonction du stade pendant lequel elles sont mesurées. Le contrôle respiratoire (RCR) évalue le couplage entre la vitesse de consommation d'O₂ et la synthèse d'ATP. Il est égal au rapport de la vitesse de consommation d'O₂ à l'état 3 (V3) divisée par celle mesurée à l'état 4 (V4) et il est toujours supérieur à 1. Une valeur égale à 1 (V3=V4) signifie que la phosphorylation de l'ADP est découplée de la consommation d'O₂.

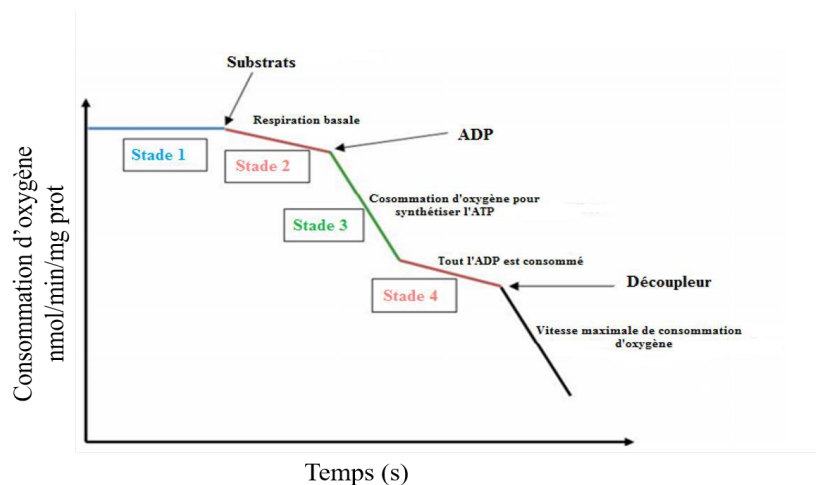


Figure 5.3: Consommation d'oxygène par les mitochondries dans différentes conditions. Les mitochondries (1 mg/ml) incubées à 30 °C (stade 1) consomment l'O₂ lorsque les substrats de la chaîne respiratoire sont ajoutés (stade 2). L'ajout d'ADP (250 μM) stimule la consommation d'oxygène (stade 3) jusqu'à son entière consommation qui induit un retour à la respiration basale (stade 4). L'ajout d'un agent découpleur permet d'évaluer la vitesse maximale de consommation d'O₂ par la chaîne respiratoire.

Un autre état respiratoire peut être déterminé, l'état découplé obtenu par l'ajout d'un protonophore tel que le p-trifluorométhoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone (FCCP). Le FCCP permet le retour des protons dans la matrice sans passer par l'ATP synthase. Cet état découplé permet ainsi d'étudier la chaîne respiratoire (sans limitation par l'ATP) lorsqu'elle fonctionne au maximum de ces capacités.

5.4.1.3 Mesure de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les dosages des activités enzymatiques des complexes I, II, III et IV ont été réalisés sur des mitochondries isolées et incubées avec l'AVP ayant subi 3 cycles de congélation/décongélation (-80 °C/25 °C) afin de les faire éclater. Le principe des dosages des complexes de la chaîne respiratoire repose sur la diminution ou l'augmentation de l'absorbance d'un substrat ou d'un produit de chacun des différents complexes [32]. Les mesures ont été effectuées à 37 °C dans un volume final de 1,5 ml par spectrophotométrie (spectrophotomètre V-530, JASCO®). Les résultats obtenus via le logiciel Spectra Manager ont été convertis en nano moles par minute par mg de protéines mitochondriales (nmol/min/mg prot) grâce à la loi de Beer-Lambert.

5.4.1.3.1 Complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase)

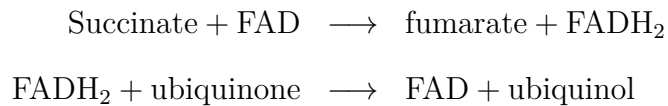
Le complexe I catalyse l'oxydation du NADH selon la réaction enzymatique suivante :



Le principe de la technique consiste à mesurer la cinétique d'oxydation du NADH, l'activité spécifique du complexe I, en présence d'un analogue de l'ubiquinone, la décylubiquinone. Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance du NADH ($\epsilon=6810 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) provoquée par son oxydation en NAD^+ est alors proportionnelle à l'activité du complexe I. Le milieu réactionnel comprend : le tampon (KH_2PO_4 25 mM, MgCl_2 5 mM, $\text{pH} = 7,4$), du KCN (250 μM), de la décylubiquinone (100 μM), les mitochondries (0,1 mg/ml) et du NADH (200 μM). Après le réglage du 0 de l'appareil la mesure a été lancée et l'absorbance a été suivie à une longueur d'onde $\lambda=340 \text{ nm}$ pendant 600 secondes. Afin de vérifier que seule l'activité du complexe I est mesurée dans ce protocole, la cinétique de l'oxydation du NADH a aussi été réalisée en présence d'un inhibiteur du complexe I (roténone 2 μM).

5.4.1.3.2 Complexe II (Succinate déshydrogénase)

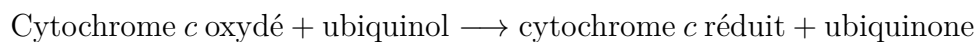
Les réactions enzymatiques catalysées par le complexe II sont :



Lors de cette réaction, le succinate réduit l'ubiquinone en ubiquinol. Le dosage du complexe II utilise un accepteur d'électron le DCIP (2,6-Dichlorophénol Indophénol) ($\varepsilon=21000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) de couleur bleue qui absorbe la lumière à $\lambda=600 \text{ nm}$. Ce dernier est réduit par l'ubiquinol formé lors de la réaction précédente et il perd alors sa couleur bleue et n'absorbe plus de lumière. Pour mesurer l'activité du complexe II, la réaction consiste donc à suivre la diminution de l'absorbance provoquée par la réduction du DCIP celle-ci étant proportionnelle à l'ubiquinol formé. Le milieu réactionnel comprend : le tampon (KH_2PO_4 10 mM, EDTA 2 mM, $\text{pH}=7,4$), de la roténone ($2 \mu\text{M}$), du succinate (6 mM), du KCN ($250 \mu\text{M}$) et les mitochondries (0,033 mg/ml). Après 5 minutes d'incubation, le 0 de l'appareil a été réglé, puis après l'ajout de décylubiquinone ($100 \mu\text{M}$) et de DCIP ($80 \mu\text{M}$) la mesure a été lancée et l'absorbance a été suivie à $\lambda=600 \text{ nm}$ pendant 600 secondes. Dans ce dosage afin de vérifier que seule l'activité du complexe II est mesurée dans ce protocole, l'expérience a aussi été réalisée en présence d'un inhibiteur du complexe II (malonate 10 mM).

5.4.1.3.3 Complexe III (Ubiquinol cytochrome *c* oxydoréductase)

La réaction enzymatique catalysée par le complexe III est la suivante :

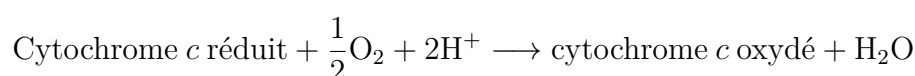


La mesure de l'activité du complexe III consiste à suivre la conversion du cytochrome *c* oxydé en cytochrome *c* réduit ($\varepsilon=19000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). En effet, l'augmentation de l'absorbance accompagnant l'apparition de la forme réduite du cytochrome *c* est proportionnelle à l'activité du complexe III. Le milieu réactionnel comprend : le tampon (KH_2PO_4 25 mM, MgCl_2 5 mM, $\text{pH} = 7,4$), les mitochondries (0,017 mg/ml), la roténone ($2 \mu\text{M}$), du KCN ($250 \mu\text{M}$) et du cytochrome *c* oxydé ($40 \mu\text{M}$). Après réglage du zéro de l'appareil le décylubiquinol ($100 \mu\text{M}$) est

ajouté et l'activité du complexe est évaluée en suivant les variations de l'absorbance à $\lambda=550$ nm durant 400 secondes. Il existe une réduction du cytochrome *c* par décylubiquinol indépendante du complexe III. Elle a été mesurée en présence et en absence d'antimycine ($1 \mu\text{M}$), l'inhibiteur spécifique du complexe III, puis retranchée de l'activité totale pour obtenir l'activité spécifique du complexe III.

5.4.1.3.4 Complexe IV (Cytochrome *c* oxydase)

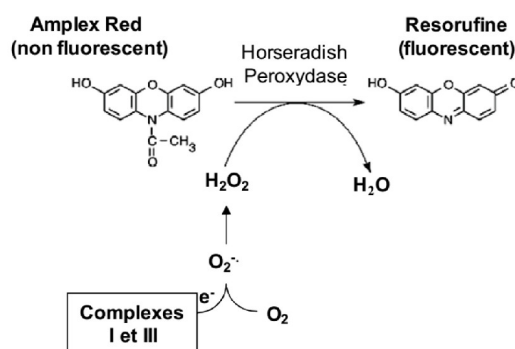
La réaction enzymatique catalysée par le complexe IV est la suivante :



La mesure de l'activité du complexe IV consiste donc à suivre l'oxydation du cytochrome *c* réduit. La disparition de la forme réduite du cytochrome *c* entraîne une diminution de l'absorbance qui est alors proportionnelle à l'activité du complexe IV. Le milieu réactionnel comprend : le tampon (KH_2PO_4 10 mM, EDTA 2 mM, MgCl_2 2 mM, $\text{pH}=7,4$) et les mitochondries (0,017 mg/ml). Après 1 min d'incubation, puis réglage du zéro de l'appareil le cytochrome *c* réduit ($33 \mu\text{M}$) est ajouté et l'activité du complexe est évaluée en suivant les variations de l'absorbance à $\lambda=550$ nm durant 200 secondes.

5.4.1.4 Mesure de la production mitochondriale de H_2O_2

La production de (H_2O_2) par les mitochondries a été estimée par spectrofluorimétrie (spectrofluorimètre FP-6300 JASCO[®]) [32]. En présence de la peroxydase de raifort l'Amplex Red (10-acetyl-3,7 dihydroxyphenoxasine) est oxydée par le (H_2O_2) en un composé fluorescent : la résorufine ($\lambda_{\text{excitation}}=563$ nm, $\lambda_{\text{émission}}=587$ nm) selon la réaction suivante :



Les mesures sont réalisées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour évaluer la respiration mitochondriale (30 °C, agitation constante, même tampon). Les mitochondries (0,2 mg/ml) sont tout d'abord placées dans une cuve contenant l'Amplex Red (10 μ M) et la peroxydase de raifort (1 U/ml) dans un volume total de 1 ml de tampon de respiration et la mesure est déclenchée. Les substrats, pyruvate/malate (5 mM chacun) ou succinate (5 mM), sont ensuite introduits dans le milieu pour initier la réaction. De la roténone (2 μ M) a été ajoutée au cours de la mesure pour bloquer le complexe I. Enfin, de l'antimycine (5 μ M) a été ajoutée pour bloquer le complexe III. Les vitesses sont exprimées en nmol H₂O₂ /min/mg de protéine.

Les mesures ont été faites en présence de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* et les molécules (B9-4-6-1 : 6-O-seneciolyantirrhinoside + 6-O-angeloylantirrhinoside et B9-6-1B- 6-4 : antirrhide) extraites de ce dernier à différentes concentrations afin d'évaluer leurs effet antioxydant.

5.4.2 Étude du dysfonctionnement mitochondrial *in vivo*

Préparation de la matrice mitochondriale

Les pellets de mitochondries issues de foie des rats traités par le VPA sont lavés deux fois avec le tampon d'isolation décrit auparavant, puis re-suspendus dans la même solution tampon. La matrice mitochondriale est extraite par congélation et décongélation suivi immédiatement par homogénéisation répétée des préparations fraîches mitochondriales afin d'éclater les mitochondries. Le dosage des protéines dans les fractions mitochondriales est réalisé par la méthode de Lowry [33].

5.4.2.1 Évaluation du statut oxydant mitochondrial

Le statut oxydatif a été évalué dans 0,5 ml de la fraction mitochondriale selon les méthodes enzymatiques colorimétriques décrites précédemment.

Le MDA a été évalué par la méthode de d'Ohkawa et ses collaborateurs [17], le dosage de GSH est effectué par la méthode d'Ellman [26] et les résultats sont exprimés en (nmol/mg prot). L'activité du GPx est évaluée par la méthode de Rotruck et ses collaborateurs [29], les résultats sont exprimés en (nmol/min/mg prot). La SOD est estimée par la méthode décrite par Flohe [25], les résultats sont exprimés en (U/mg prot).

5.5 Évaluation du dysfonctionnement lysosomal

5.5.1 Évaluation du statut oxydant lysosomal

La préparation de la fraction lysosomale a été réalisée selon la méthode décrite par Marrzella et Glaumann [34].

Le MDA a été évalué par la méthode décrite par Ohkawa et ses collaborateurs [17] et les résultats sont exprimés en (nmol/mg prot). L'activité de la SOD est estimée par la méthode décrite par Marklund et Marklund [35] et les résultats sont exprimés en (U/mg prot).

5.5.2 Évaluation des enzymes lysosomales

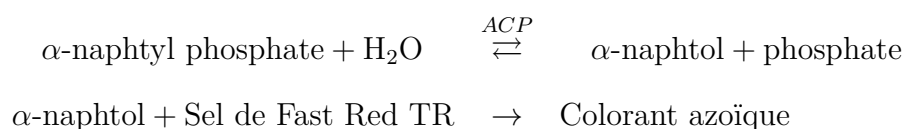
5.5.2.1 Mesure de la myéloperoxydase (MPO) hépatique

L'accumulation des neutrophiles au niveau du foie a été mesurée en estimant l'activité enzymatique de la MPO décrite précédemment. L'activité MPO a été évaluée selon le protocole suivi par Posadas et ses collaborateurs [16] et les résultats sont exprimés en (U/mg tissu).

5.5.2.2 Dosage de l'activité enzymatique lysosomale

5.5.2.2.1 La phosphatase acide (ACP)

Les phosphatases acides (ACP) sont des enzymes trouvées en grande quantité plus particulièrement dans la prostate, les os, les globules rouges, le foie et les reins. Ces enzymes hydrolysent les phosphates organiques et libèrent les phosphates minéraux insolubles. Elles sont augmentées lors des atteintes de ces différents organes ou tissus. La détermination de l'activité des phosphates acides par la méthode cinétique se fait selon les réactions suivantes:



L'activité de l'ACP a été mesurée selon la méthode de Linhardt et Walter [36] et les résultats sont exprimés en micromoles de phénol libéré par heure par milligramme de protéine (μmol de p-nitrophenol/h/mg prot).

5.5.2.2.2 La β -N-acetylglucosaminidase (β -NAG)

L'hexosaminidase, parfois appelée β -N-acétylhexosaminidase, libère la N-acétylglucosamine et la N-acétylgalactosamine terminales liées à la β à partir d'une variété de substrats. Elle hydrolyse les résidus terminaux N-acétyl-D-hexosamine non réducteurs. L'activité de la β -NAG a été déterminée avec le substrat chromogène p-nitrophényl-N-acétyl- β -D-glucosaminide selon la méthode de Maruhn [37] et les résultats sont exprimés en micromoles de phénol libérés par heure par milligramme de protéine (μmol de p-nitrophenol/h/mg prot).

5.5.2.2.3 La Cathepsine-D

La cathepsine-D est une protéase lysosomale normale qui est exprimée dans toutes les cellules. Elle constitue l'unique protéase à aspartate lysosomiale qui est impliquée dans la dégradation intracellulaire et extracellulaire des protéines. Les dosages ont été faits selon le protocole suivi par Etherington [38] en déterminant la quantité de la tyrosine libérée. L'activité de la Cathepsine D est exprimée en micromoles de la tyrosine libérée par heure par 100 milligrammes de protéine (μmol tyrosine/h/100 mg prot).

5.5.2.2.4 La β -glucuronidase (β -GLU)

L'activité de la β -glucuronidase (β -GLU) a été mesurée par la méthode de Kawai et Anno [39] en utilisant le p-nitrophényl- β -glucuronide comme substrat. L'activité enzymatique a été déterminée en mesurant la quantité de p-nitrophényl libérée. Les résultats sont exprimés en micromoles de p-nitrophenol libéré par heure par milligrammes de protéine (μmol de p-nitrophenol/h/mg prot).

5.5.3 Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes

La déstabilisation de la membrane lysosomale peut être étudiée par coloration avec l'acridine orange (AO) [40]. L'AO ($\lambda_{excitation\ Max} = 490$ nm, $\lambda_{émission\ Max} = 525$ nm) est une sonde lysosomotropique lipophile, cationique, capable de traverser la membrane cytoplasmique et celle des organites cellulaires. L'AO est un colorant métachromatique qui se caractérise par sa capacité à émettre une fluorescence verte en milieu basique et une fluorescence orange/rouge en milieu acide. La quantité de fluorescence orange/rouge sera donc proportionnelle au volume

et à la quantité de compartiments acides dans la cellule. La perméabilisation de la membrane lysosomale se caractérise par une diminution de la fluorescence orange/rouge.

Afin d'évaluer le pourcentage des cellules contenant des lysosomes déstabilisés par coloration à l'AO, les cellules ont été incubées avec l'AVP 72 heures (0,1 - 0,3 - 1 - 3 - 10 et 30 mM) puis mises en suspension dans 1 ml de PBS. La suspension cellulaire a été incubée en présence de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'AO pendant 15 min à 37 °C. L'analyse a été réalisée par spectrofluorimétrie; les fluorescences verte et rouge ont été respectivement sélectionnées respectivement par des filtres passe-bande $\lambda=520\pm 20$ nm et passe-long $\lambda=630$ nm. Pour chaque échantillon, la fluorescence a été quantifiée sur 10 000 cellules sur une échelle logarithmique en utilisant un spectrofluorimètre (spectrofluorimètre FP-6300 JASCO®). Des mesures similaires ont été faites en présence de la L-Leucine-methyl-ester-hydrochloride (LLeMe) de (0,03 - 0,01 - 0,3 et 1 mM). Cet agent chimique induit une rupture des membranes lysosomales et est utilisé comme contrôle.

L'évaluation d'effet protecteur des molécules (B9-4-6-1 et B9-6-1B-6-4) vis-à-vis la déstabilisation de la membrane lysosomale induite par l'AVP (10 mM) a été faite par l'incubation des lignées cellulaires HepG2 avec l'AVP 72 heures en présence de ces dernières à différentes concentrations (3 - 10 - 30 - 100 et 300 μM).

5.6 Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne \pm écart type. Les valeurs IC_{50} (Concentration inhibitrice de 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Pour les tests *in vivo* les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Les comparaisons multiples sont faites par le test ANOVA à un facteur suivi du test HSD de Tukey. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05. Pour les tests *in vitro* sur les cellules HepG2 les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur-type de la moyenne. Les comparaisons multiples sont faites par le test ANOVA à un facteur suivi du test Dunnet. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

Référence bibliographiques

- [1] Harborne JB. Phytochemical Methods, a guide to modern techniques of plant analysis. 3rd ed. London: Chapman and Hall, 1998.
- [2] Khandelwal KR. Preliminary phytochemical screening in practical pharmacognosy techniques and experiments. 8th ed. Pune: Nirali Publication, 2001; 149-156.
- [3] Li HB, Cheng KW, Wong CC, et al. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chem.* 2007; 102:771-776.
- [4] Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot JM. Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:1370-1373.
- [5] Bahorun T, Grinier B, Trotin F, et al. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung.* 1996; 46:1086-1089.
- [6] Ohinishi M, Morishita H, Iwahashi H, et al. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry.* 1994; 36:579-583.
- [7] Maataoui BS, Hmyene A, Hilali S. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*opuntia ficus indica*). *Lebanese Sci J.* 2006; 7:3-8.
- [8] Markowicz Bastos DH, Saldanha LA, Catharino RR, et al. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS. from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules.* 2007; 12:423-432.
- [9] Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavenging. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 315:161-169.
- [10] Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process.* 2011; 89:217-233.
- [11] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr.* 1986; 44:307-15.
- [12] Sreejayan N, Rao MN. Nitric oxide scavenging by cucuminoids. *J Pharm Pharmacol.* 1997; 49:105-107.
- [13] Sakat SS, Tupe PN, Juvekar AR. In vitro anti-inflammatory activity of aqueous and methanol extracts of *Erythrina indica* lam leaves. *Pharmacologyonline.* 2009; 3:221-229.

- [14] Chippada SC, Volluri SS, Bammidi SR, Vangalapati M. In vitro anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Centella asiatica* by HRBC membrane stabilisation. *Rasayan J Chem.* 2011; 4:457-460.
- [15] Srivastava S, Singh P, Jha KK, et al. Antiinflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of Aerial Parts of *Costus speciosus* Koen. *Indian J Pharm Sci.* 2013; 75:83-88.
- [16] Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol.* 2004; 142:331-338.
- [17] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95:351-358.
- [18] Guerra AS, Malta DJ, Laranjeira LP, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indo-leimidazolidine derivatives. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11:1816-1822.
- [19] Brito GA, Souza MH, Melo-Filho AA, et al. Role of pertussis toxin A subunit in neutrophil migration and vascular permeability. *Infec Immun.* 1997; 65:1114-1118.
- [20] Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43:645-657.
- [21] Khan S, Ahmad T, Parekh CV, et al. Investigation on sodium valproate induced germ cell damage, oxidative stress and genotoxicity in male Swiss mice. *Reprod Toxicol.* 2011; 32:385-394.
- [22] Aktas A, Nergiz Y, Akkus M. The effect of valproic acid on rat ovarium and the protective role of vitamin E and folic acid: an ultrastructural study. *Afr J Biotechnol.* 2010; 9:5616-5622.
- [23] Folch J, Less M, Sloane GT. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem.* 1959; 226:497-509.
- [24] Aebi H. Catalase in vitro. *Method Enzymol.* 1984; 105:121-126.
- [25] Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Method Enzymol.* 1984; 105:114-121.
- [26] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 82:70-77.
- [27] Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, et al. Hepatoprotective effect of acetonic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2011; 63:363-370.

- [28] Seyyedi MA, Farahnak A, Jalali M, Rokni MB. Study on glutathione-S-transferase (GST) inhibition assay by triclabendazole. *Protoscoleces (Hydatid Cyst; Echinococcus granulosus) and sheep liver tissue. Iran J Public Health.* 2005; 34:38-46.
- [29] Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973; 179:588-590.
- [30] Edmondson JM, Armstrong LS, Martinez AO. A rapid and simple MTT based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *J Tissue Cult Meth.* 1988; 11:15-17.
- [31] Wu D, Yotnda P. Production and Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cancers. *J Vis Exp.* 2011; 57:e3357.
- [32] Long R, Salouage I, Berdeaux A, et al. CORM-3, a water soluble CO-releasing molecule, uncouples mitochondrial respiration via interaction with the phosphate carrier. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1837:201-209.
- [33] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 93:265-275.
- [34] Marzella L, Glaumann H. Increased degradation in rat liver induced by Vinblastine. I Biochemical characterization. *Laboratory Investigation.* 1980; 42:8-17.
- [35] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974; 47:469-474.
- [36] Linhardt K, Walter K. Phosphatases (phosphomonoesterase). In *Methods in enzymatic analysis.* (Bergmeyer HU, Ed.), 2nd printing revised, Academic Press: New York. 1965; 779-787.
- [37] Maruhn D. Rapid colorimetric assay of β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta.* 1976; 73:453-461.
- [38] Etherington DJ. The nature of the collagenolytic cathepsin of rat liver and its distribution in other rat tissues. *Biochem J.* 1972; 127:685-692.
- [39] Kawai Y, Anno K. Mucopolysaccharide-degrading enzymes from the liver of the squid, *Ommastrephes sloani pacificus*. I. Hyaluronidase. *Biochim Biophys Acta.* 1971; 242:428-436.

Troisième Partie

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 6

Résultats

6.1 Screening phytochimique

6.1.1 Criblage phytochimique préliminaire

Les résultats du criblage phytochimique préliminaire des parties aériennes de *L. tingitana* sont présentés dans le (tableau 6.1). L'analyse a montré la présence plus importante des alcaloïdes et des stérols non saturés, une bonne présence des terpénoïdes, des flavonoïdes et des saponines, tandis que les leucoanthocyanes et les tannins ont été détectées avec des traces. Des résultats négatifs ont été observés pour les coumarines, les triterpénoïdes, les stérols saturés et les anthocyanes.

6.1.2 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Les résultats figurant dans le (tableau 6.2) révèlent que la fraction *n*-BuOH de *L. tingitana* est la plus riche en polyphénols ($113,976 \pm 2,56$ mg GAE/g d'extrait) comparativement à la fraction EtOAc ($61,61 \pm 0,89$ mg GAE/g d'extrait) et la fraction CHCl₃ ($15,68 \pm 0,32$ mg GAE/g d'extrait). Malgré la richesse de la fraction *n*-BuOH en polyphénols, elle ne renferme que (45,98%) des polyphénols sous forme de flavonoïdes. Par contre, la majorité des polyphénols contenus dans la fraction EtOAc se présentent sous forme de flavonoïdes (96,75%). La fraction CHCl₃ contenant le taux le plus faible des polyphénols, elle ne comprend que (43,43%) de flavonoïdes. De point de vue qualitatif, les flavonoïdes de la phase butanolique sont généralement glycosidés alors que ceux de la phase acétate sont dans la majorité des aglycones.

Table 6.1: Résultats des tests préliminaires des compositions chimiques des parties aériennes de *L. tingitana*.

Groupes chimiques	Parties aériennes
Alcaloïdes	+++
Coumarines	–
Terpénoïdes	++
Stérols non saturés	+++
Triterpénoïdes	–
Stérols saturés	–
Anthocyanes	–
Leucoanthocyanes	+
Flavonoïdes	++
Saponines	++
Tannins	+

"+" Présence, "–" Absence.

Table 6.2: Teneur en polyphénols totaux et des flavonoïdes.

Extrait	Teneur en polyphénols (mg GAE/g d'extrait)	Teneur en flavonoïdes (mg QE/g d'extrait)
<i>n</i> -BuOH <i>L. tingitana</i>	113.98 ± 2.56	52.41 ± 1.63 (45.98 %)
EtOAc <i>L. tingitana</i>	61.61 ± 0.89	59.61 ± 0.89 (96.75 %)
CHCl ₃ <i>L. tingitana</i>	15.68 ± 0.32	6.81 ± 0.12 (43.43 %)

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

L'analyse de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* avec la méthode LC-MS en utilisant deux profils a montré la présence de quelques types des métabolites notamment les terpénoïdes. Les résultats montrent la présence de trois pics majoritaires identifiés par masse qui correspondent aux : (1) antirrhinose, (2) 6-*O*-seneciolyantirrhinose, (3) 6-*O*-angeloylantirrhinose, et (4) antirrhine qui sont bien connu dans le genre *Linaria*.

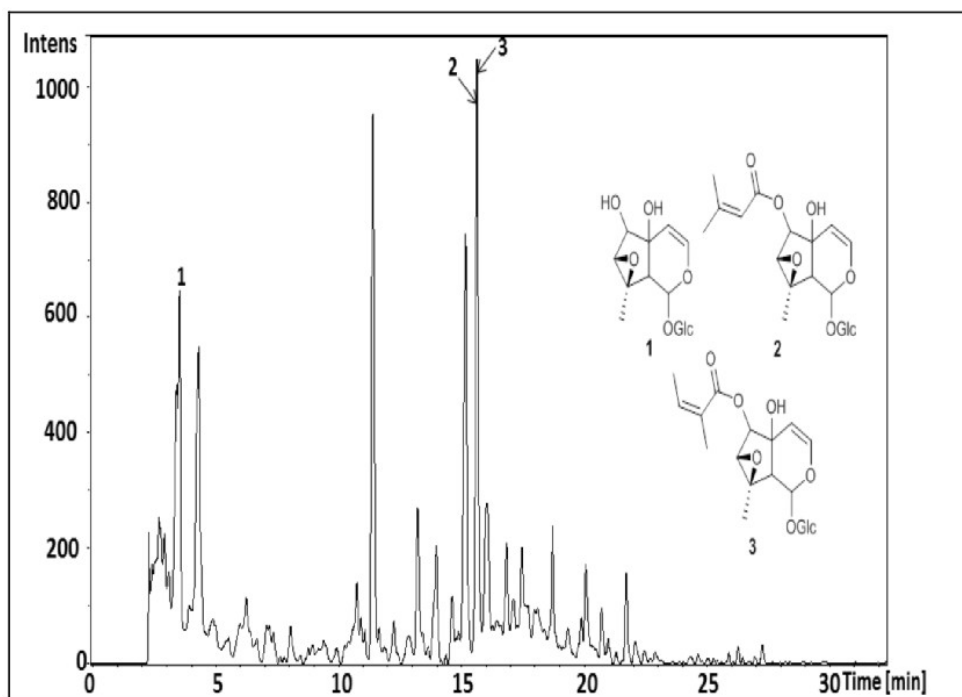


Figure 6.1: Le profile LC-MS de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (1).
 (1) : antirrhinoside ; (2) : 6-O-seneciolyantirrhinoside ; (3) : 6-O-angeloylantirrhinoside.

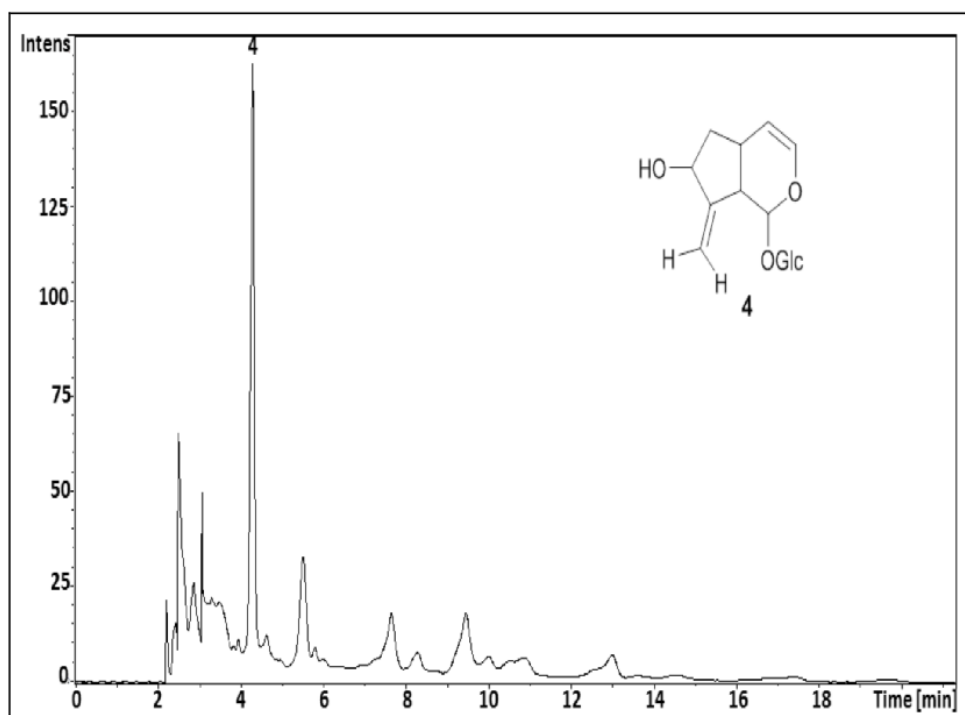


Figure 6.2: Le profile LC-MS de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (2).
 (4) : antirrhidine.

6.2 Screening biologique

6.2.1 Evaluation de l'activité antioxydante

6.2.1.1 Effet scavenger du radical DPPH°

En présence d'un produit naturel antioxydant, le DPPH°, qui est un radical libre stable d'une couleur violette, prend un électron ou un hydrogène de l'antioxydant et se convertit en α -diphenyl- β -picryl hydrazine doté d'une couleur jaune. La diminution croissante d'absorbance reflète la quantité de DPPH° réduite, signe de l'activité anti-radicalaire des produits naturels. D'après la (figure 6.3), la phase AcOEt est la plus active vis-à-vis le DPPH° ($IC_{50} = 82,40 \pm 1,60 \mu\text{g/ml}$) comparativement à la phase *n*-BuOH ($IC_{50} = 122,26 \pm 8,55 \mu\text{g/ml}$), et la phase CHCl_3 ($IC_{50} = 255,40 \pm 8,55 \mu\text{g/ml}$). Ces résultats se concordent avec le contenu flavonoïdique de chaque fraction évoquée dans le (tableau 6.2). La vitamine C et Trolox ont montré une activité anti-radicalaire très importante avec des valeurs ($IC_{50} = 11,44 \pm 0,32$ et $IC_{50} = 4,60 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$) respectivement.

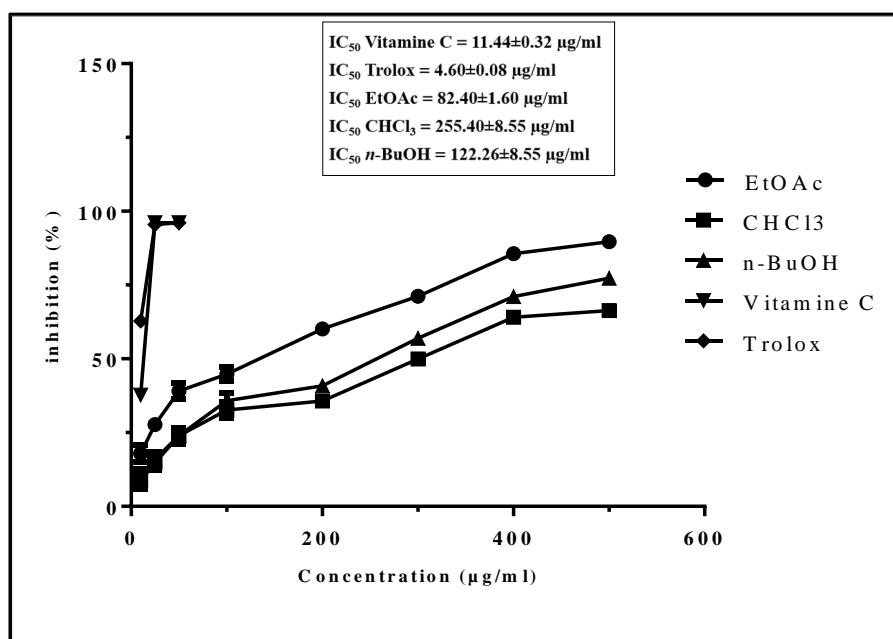


Figure 6.3: L'activité antioxydante des trois extraits de *L. tingitana*: CHCl_3 , AcOEt et *n*-BuOH vis-à-vis le radical DPPH°.

Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3)

6.2.1.2 Le pouvoir chélateur ferreux

Le test du pouvoir chélateur du fer mesure la capacité des antioxydants à entrer en compétition chélatrice avec le ferrozine visant l'ion ferreux. La (figure 6.4) montre que la capacité chélatrice de la fraction EtOAc ($IC_{50} = 89,67 \pm 0,65 \mu\text{g/ml}$), avec une concentration dépendante, est la plus considérable comparativement à la fraction *n*-BuOH ($IC_{50} = 113,13 \pm 1,19$) et la fraction CHCl_3 ($IC_{50} = 101,40 \pm 1,78 \mu\text{g/ml}$). A la concentration $600 \mu\text{g/ml}$ les trois fractions ont manifesté un pourcentage d'inhibition dans l'ordre suivant EtOAc ($88,25 \pm 0,13\%$), *n*-BuOH ($80,07 \pm 0,06\%$), CHCl_3 ($69,24 \pm 0,19\%$). Le pouvoir chélateur dépendant de la présence des principes réducteur est en concordance avec le contenu qualitatif et quantitatif de ces fractions illustré dans le (tableau 6.1).

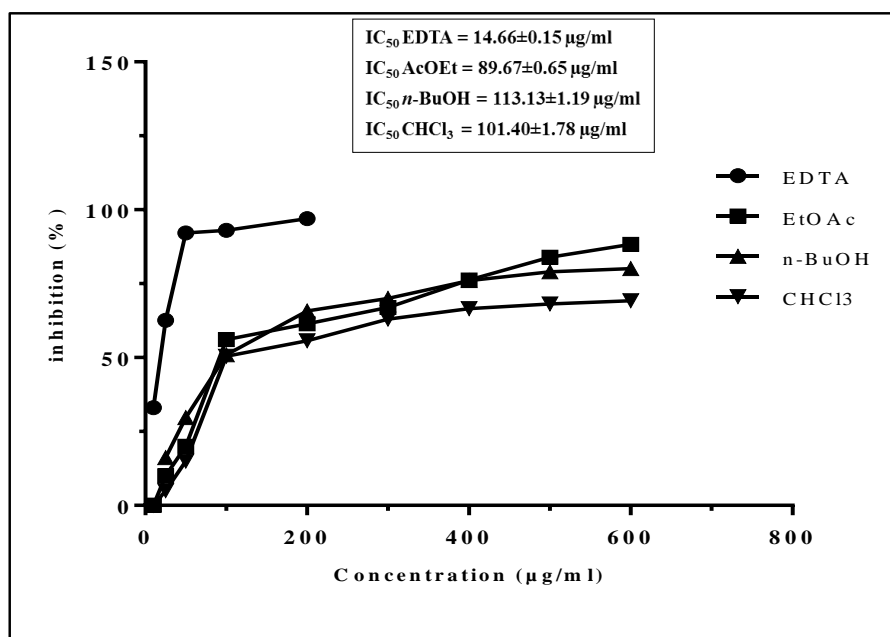


Figure 6.4: Effet chélateur des trois extraits *n*-BuOH, EtOAc et CHCl_3 de *L. tingitana*. Chaque point représente la moyenne \pm SD ($n=3$).

6.2.1.3 Test de blanchissement de β -carotène

L'oxydation d'acide linoléique produit des hydroperoxides, qui sont des radicaux libres dérivés attaquant le chromophore de β -carotène et aboutissent au blanchissement de son émulsion réactionnelle. La (figure 6.4) montre que l'absorbance diminue rapidement dans le contrôle de

($1,14 \pm 0,01$) à ($0,05 \pm 0,01$). Par contre, dans le cas de la fraction *n*-BuOH ($100 \mu\text{g/ml}$), la diminution de l'absorbance de ($1,140 \pm 0,008$) jusqu'à ($0,677 \pm 0$) était plus lente puis elle atteint un plateau jusqu'à 48 heures. L'activité inhibitrice du blanchissement de cette fraction est de l'ordre de à ($59,36 \pm 0,41\%$) et celle du contrôle positif est ($87,72 \pm 0,20\%$) (figure 6.4).

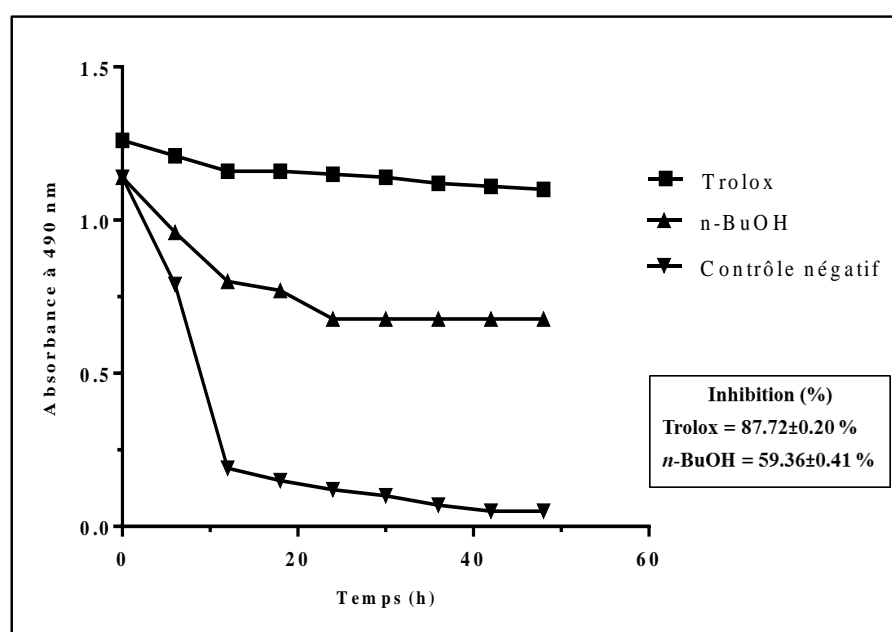


Figure 6.5: Test de blanchissement de β -carotène.

Variations de l'absorbance à 490 nm avec le temps dans les émulsions β -carotène/linoléique mélangé avec l'extrait *n*-BuOH ou le standard. Chaque point représente la moyenne \pm SD ($n=3$).

6.2.1.4 Pouvoir réducteur

La (figure 6.6) montre que l'extrait *n*-BuOH a le pouvoir de réduire l'ion ferricyanide ferrique via l'augmentation de l'absorbance avec la concentration. Cependant cet extrait ($IC_{50} = 19,39 \pm 5,72 \mu\text{g/ml}$) est moins efficace par rapport au Trolox utilisé comme référence ($IC_{50} = 1,79 \pm 0,84 \mu\text{g/ml}$). Pour atteindre une valeur d'absorbance de ($1,35 \pm 0,01$) il a fallu avoir une concentration de ($1200 \mu\text{g/ml}$) d'extrait *n*-BuOH.

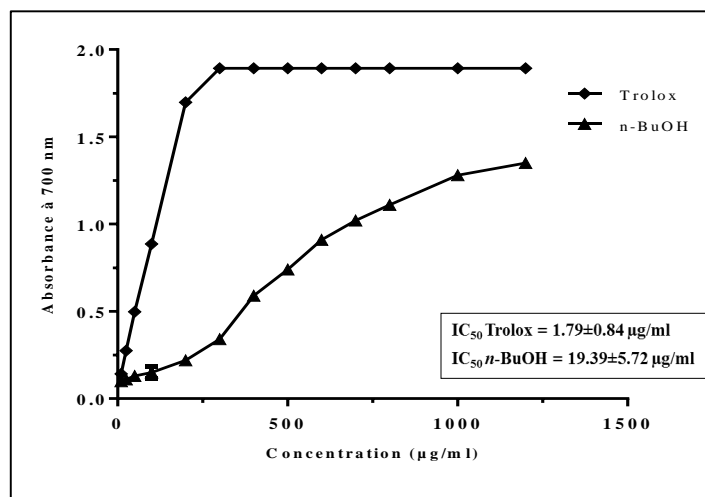


Figure 6.6: Pouvoir réducteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana*. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3).

6.2.1.5 Activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO)

Au pH physiologique, le (NO) issue de la solution aqueuse de nitroprussiate de sodium interagit avec l'oxygène pour produire l'ion nitrite. La capacité scavenger du (NO) induite par les antioxydants est déterminée par la diminution de l'absorbance à $\lambda=546$ nm. La (figure 6.7) montre que l'extrait *n*-BuOH inhibe la formation du nitrite d'une façon dépendante de la dose. L'inhibition maximale du (NO) ($77,28 \pm 1,47\%$) a été observée à une concentration élevée de ($1300 \mu\text{g/ml}$) comparativement au standard Trolox ($78,73 \pm 1,89\%$) qui nécessite seulement une concentration de $300 \mu\text{g/ml}$.

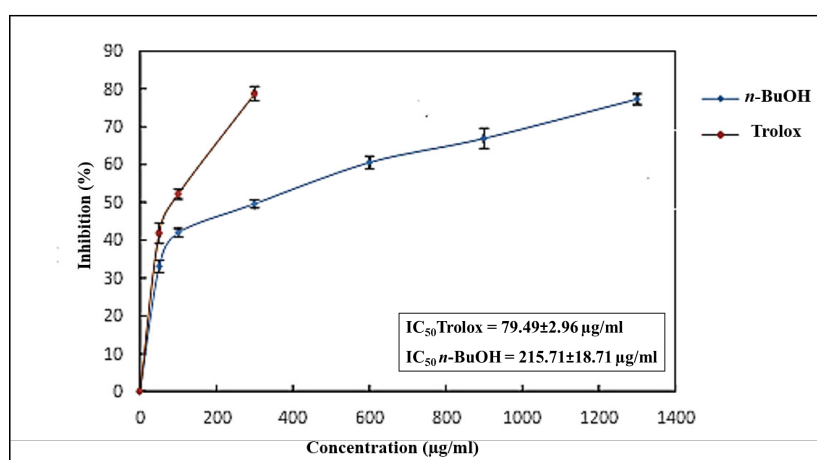


Figure 6.7: L'effet scavenger de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* contre le radical (NO). Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3).

Les valeurs IC_{50} de l'extrait *n*-BuOH et du standard prouvant un effet scavenger vis-à-vis le (NO) étaient ($215,71 \pm 18,71 \mu\text{g/ml}$) et ($79,49 \pm 2,96 \mu\text{g/ml}$) respectivement. La capacité neutralisant le (NO) pourrait être due à la présence des constituants antioxydants qui entrent en compétition avec l'oxygène pour réagir avec le monoxyde d'azote.

6.2.2 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

6.2.2.1 Inhibition de la dénaturation de l'albumine

La (figure 6.8) expose l'inhibition de la dénaturation de l'albumine sous l'effet de la chaleur par l'extrait *n*-BuOH (50-1300 $\mu\text{g/ml}$) et le diclofénac (50-300 $\mu\text{g/ml}$). L'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* a montré une inhibition de la dénaturation de l'albumine dépendante de la concentration dont l'inhibition maximale ($64,70 \pm 2,18\%$) a été enregistrée à (1300 $\mu\text{g/ml}$). Tandis que, l'inhibition maximale ($80,91 \pm 1,32\%$) du diclofénac a été enregistrée à (300 $\mu\text{g/ml}$). Ces résultats se reflètent clairement par les valeurs IC_{50} du *n*-BuOH et du diclofénac qui sont respectivement ($485,33 \pm 43,83 \mu\text{g/ml}$) et ($35,98 \pm 0,74 \mu\text{g/ml}$) (figure 6.8).

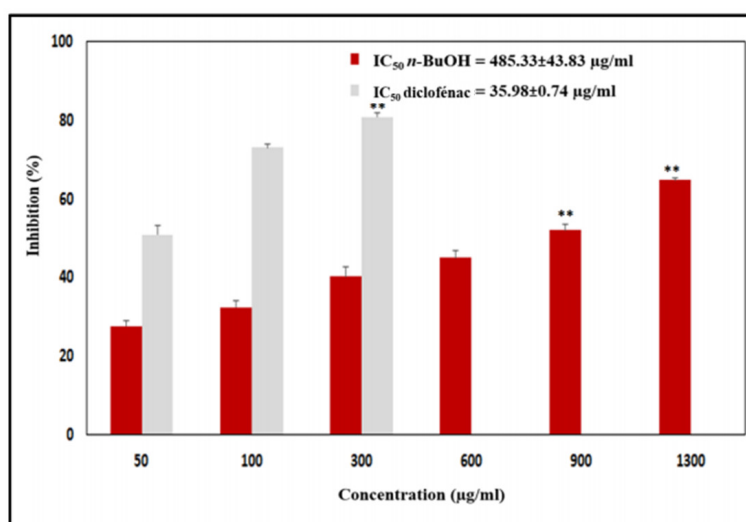


Figure 6.8: Effet de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* sur l'inhibition de la dénaturation de l'albumine.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3). (** $P < 0.01$) différence significative par rapport au diclofénac.

6.2.2.2 Stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC)

Afin d'étudier d'autres mécanismes anti-inflammatoires de l'extrait *n*-BuOH, on a investigué la stabilisation des membranes des globules rouges. La (figure 6.9) montre que l'extrait *n*-BuOH a maintenu la stabilité des membranes des érythrocytes en inhibant la lyse des membranes induite par l'hypotonie. L'inhibition maximale ($65,58 \pm 0,50\%$) exercée par l'extrait *n*-BuOH a été retenue à une concentration de ($1300 \mu\text{g/ml}$) avec une IC_{50} ($569,39 \pm 63,93 \mu\text{g/ml}$). Le médicament de référence, le diclofénac, a manifesté une inhibition maximale ($82,56 \pm 0,86\%$) à ($300 \mu\text{g/ml}$) avec une IC_{50} équivalant ($34,71 \pm 5,26 \mu\text{g/ml}$).

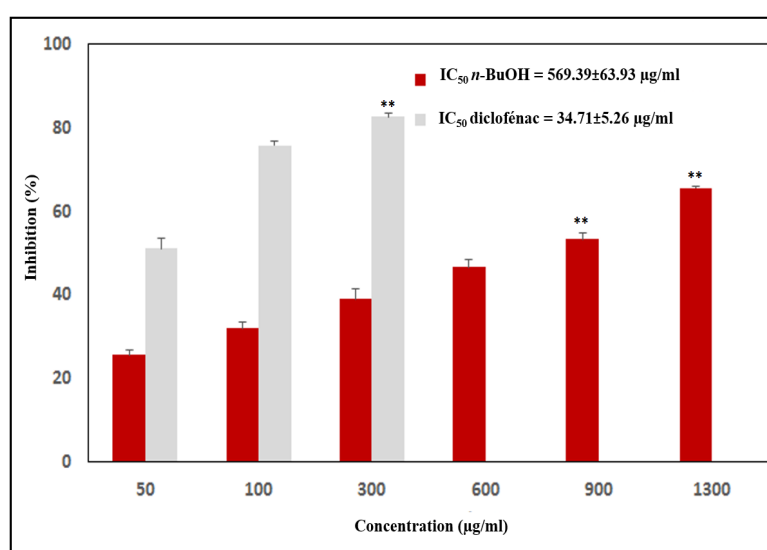


Figure 6.9: Effet de la phase *n*-BuOH de *L. tingitana*. sur la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n=3$). (** $P < 0.01$) différence significative par rapport au diclofénac.

6.2.2.3 Détermination du volume de l'œdème de la patte induit par la carragénine

L'œdème induit par la carragénine est un modèle expérimental très utilisé dans les études de l'inflammation aiguë. Dans notre étude, la progression de volume d'œdème inflammatoire, qui indique les niveaux d'inflammation, a été suivis entre les (1 et 24 heures) après l'injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche des rats. La (figure 6.10) montre que l'extrait *n*-BuOH à (200 mg/kg) a significativement ($p < 0,01$) réduit le gonflement dès la première heure ($44,21\%$) jusqu'à la dernière phase (24 heures) ($61,71\%$).

La réduction du gonflement retenue à la dose (100 mg/kg) était inférieure à celui de la dose (200 mg/kg) durant toute la période expérimentale. Ces résultats pourraient être clairement comparables à ceux du diclofénac (10 mg/kg), qui a prouvé (41,29%) de réduction la première heure et (77,95%) de réduction après 24 heures.

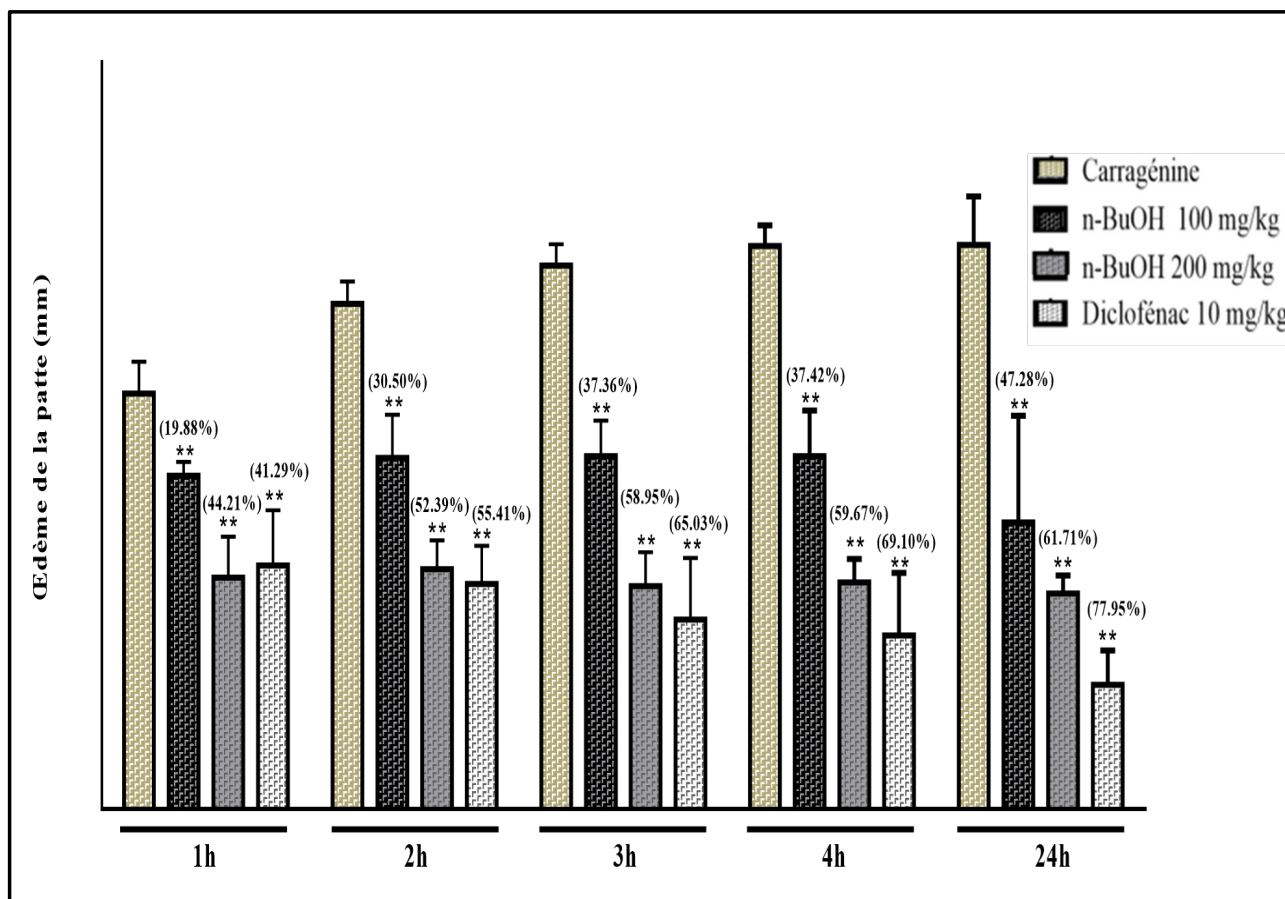


Figure 6.10: Effet anti-inflammatoire de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* sur l'œdème de la patte du rat induit par la carragénine.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=5). (** $P < 0.01$) différence significative par rapport au témoin. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

6.2.2.4 Activité de la myéloperoxydase (MPO) dans les tissus des pattes

L'injection de la carragénine au niveau de la patte des rats se traduit par une augmentation significative de l'activité enzymatique tissulaire de la MPO ($6.2 \pm 0,66$ U/mg tissu) ce qui confirme l'accumulation des cellules inflammatoires dans le tissu de la patte endommagé durant 24 heures. Le traitement des rats par des doses de (100 et 200 mg/kg) d'extrait *n*-BuOH a permis de diminuer l'activité de la MPO jusqu'à (35,55% et 59,68%) respectivement. Le diclofénac (10 mg/kg) réduit l'activité de la MPO à (79,45%) (figure 6.11).

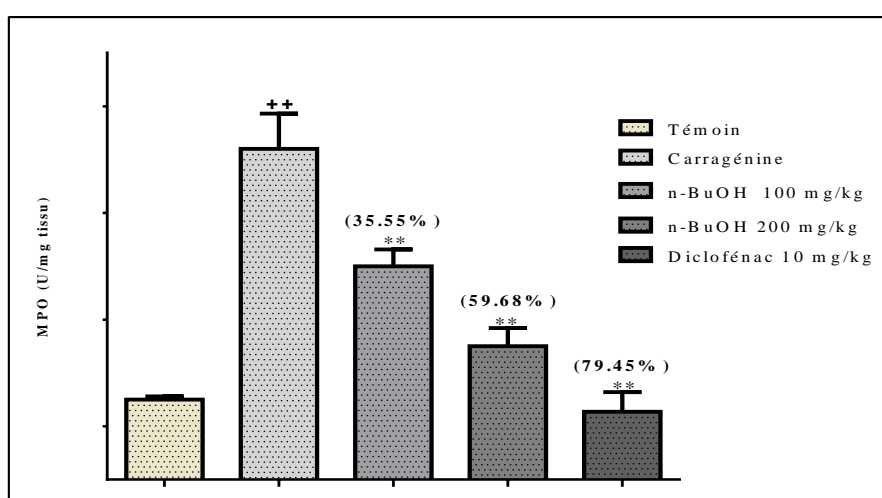


Figure 6.11: Effet anti-inflammatoire de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* sur l'activité de la MPO dans les tissus des pattes des rats.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=5). (++) $P < 0.01$ différence significative par rapport au groupe témoin; (** $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe carragénine. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

6.2.2.5 Taux de malondialdéhyde (MDA) dans les tissus des pattes

Le taux de MDA, considéré comme le marqueur le plus important de la peroxydation lipidique, a été évalué après 24 heures de l'injection de la carragénine. Les rats injectés par la carragénine ont subi une augmentation significative du taux de MDA ($15,02 \pm 0,59$ nmol/mg tissu) (figure 6.12).

Le traitement des rats par des doses de (100 et 200 mg/kg) d'extrait *n*-BuOH a permis de réduire le taux de MDA à ($10,32 \pm 0,72$ nmol/mg tissu) et ($7,14 \pm 0,69$ nmol/mg tissu), valeurs correspondant à (31,29%) et (52,46%) d'inhibition de la peroxydation lipidique. Le diclofénac a prouvé une inhibition de l'ordre de (62,93%) (figure 6.12).

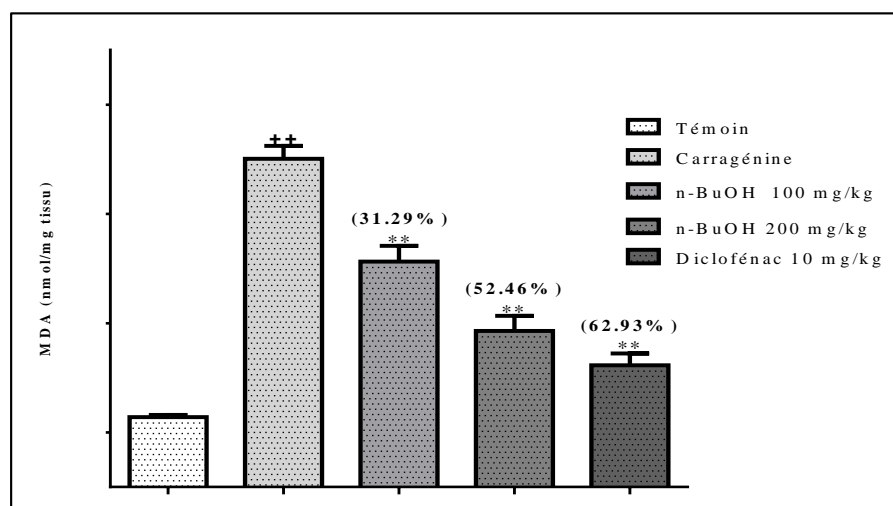


Figure 6.12: Effet anti-inflammatoire de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* sur la production de MDA dans les tissus des pattes des rats.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=5). (++) $P < 0.01$ différence significative par rapport au groupe témoin ; (** $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe carragénine. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

6.2.2.6 Étude histologique

L'analyse histopathologique au niveau des tissus de la patte des rats traités par le carragénine a révélé des altérations tissulaires très importantes se manifestant par une hyperplasie dermique et épidermique, une perte du tissu conjonctif, des vacuoles spongieuse, et une infiltration des cellules inflammatoires (figure 6.13 B). Ces lésions sont moins sévères chez les rats co-traités avec l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) ou avec le diclofénac (10 mg/kg)(figure 6.13 C et D). La dose de (100 mg/kg) *n*-BuOH s'est avéré insuffisante de donner un effet positif.

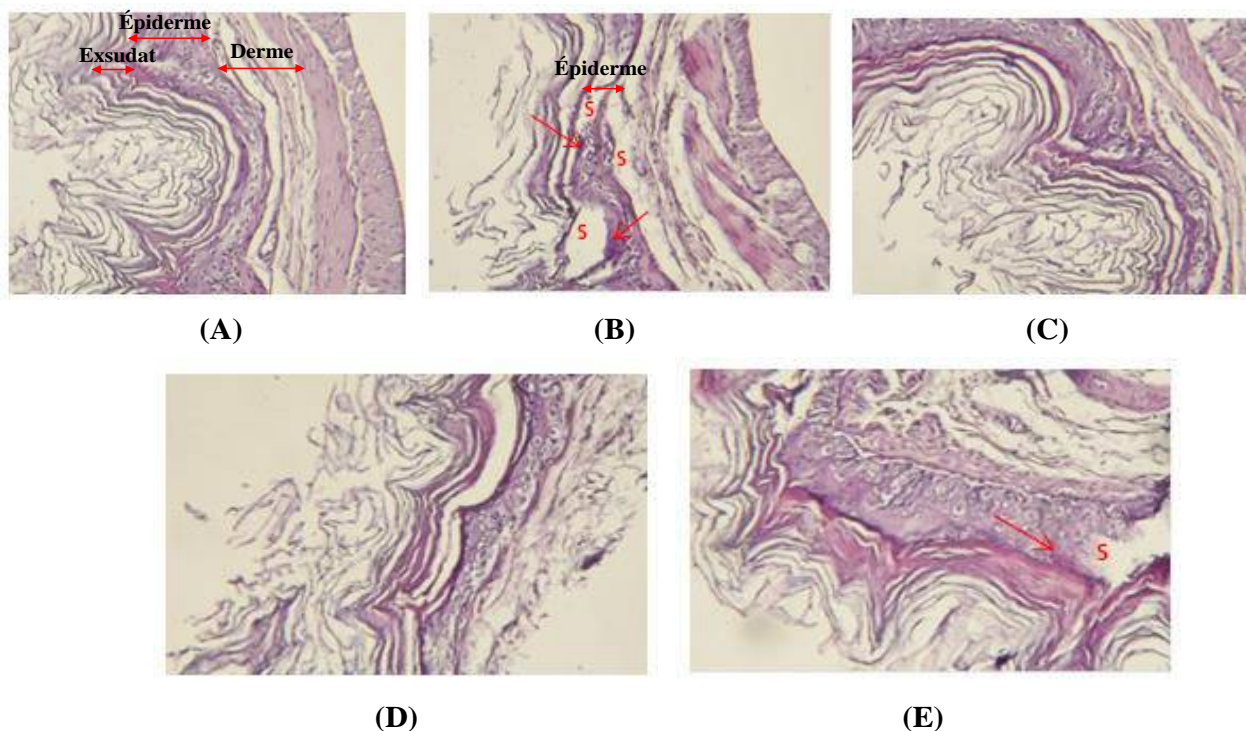


Figure 6.13: Des micro-photographies de l'analyse histopathologique, représentent l'effet anti-inflammatoire sur les pattes des rats co-traités oralement par l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana*. (A) témoin; (B) contrôle au carragénine; (C) diclofénac (10 mg/kg); (D) l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg); (E) l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (100 mg/kg) (H&E;100X). Les flèches rouges indiquent l'infiltration des cellules dans le derme, S (spongieuse).

6.2.2.7 Péritonite induite par la carragénine

Afin d'évaluer l'effet inhibiteur probable de l'extrait *n*-BuOH sur la migration des cellules au niveau de la cavité péritonéale, on a réalisé un test de péritonite induite par la carragénine. Quatre heures après l'induction de la péritonite, le nombre total des leucocytes et des neutrophiles a augmenté à $(13,5 \pm 0,60 \times 10^6 \text{ cellules/ml})$ et $(10,04 \pm 1,25 \times 10^6 \text{ cellules/ml})$ respectivement. Le prétraitement avec l'extrait *n*-BuOH (100 et 200 mg/kg) 1 heure avant l'injection par la carragénine a significativement ($P < 0,01$) amélioré ces taux perturbés. Seulement l'effet réduisant des taux perturbés des leucocytes et des neutrophiles dans le cas de la dose (200 mg/kg) est plus exprimé (66,91% - 54,46% et 54,28%) par rapport à l'effet de la dose (100 mg/kg) (40,52% - 34,67% et 32,34%) et pourrait être considéré comme comparable à celui du diclofénac (76,67% - 76,1% et 80,31%) (figure 6.14).

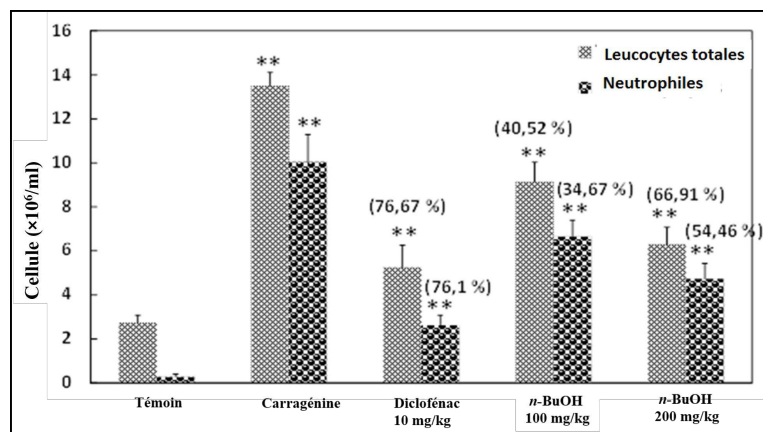


Figure 6.14: Effet anti-inflammatoire de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* sur la péritonite induite par le carragénine.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=5). (** $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe témoin ; (** $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe carragénine. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

6.2.2.8 Taux du NO dans la cavité péritonéale

L'extrait *n*-BuOH a montré un effet protecteur considérable vis-à-vis l'inflammation induite par la carragénine en inhibant la production du (NO) dans la cavité péritonéale. La dose (200 mg/kg) exprima un taux d'inhibition (54,28%) plus efficace par rapport à la dose de (100 mg/kg) (32,34%). Dans le cas du diclofénac (10 mg/kg) l'inhibition atteignit (80,31%) (figure 6.15).

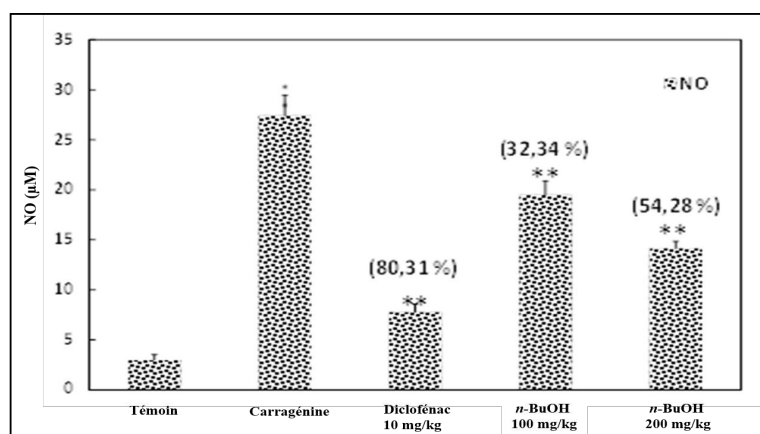


Figure 6.15: Effet anti-inflammatoire de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* sur la production d'oxyde nitrique (NO) dans la cavité péritonéale des rats.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=5). (** $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe témoin; (** $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe carragénine. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

La conclusion qu'on peut tirer de cette partie c'est que L. tingitana comprend une panoplie de métabolites secondaires dont les plus intéressants sont les polyphénols et les flavonoïdes. L'analyse de la fraction n-BuOH par LC-MS a montré la présence des terpénoïdes tels les irridoïdes bien connus dans le genre Linaria. La fraction n-BuOH possède des propriétés antioxydantes très importantes dont leur mise en évidence est effectuée en utilisant différents systèmes (DPPH[•], β -carotène, le pouvoir réducteur, l'effet chélateur) et des propriétés anti-inflammatoires qui sont élucidées via plusieurs tests (dénaturation de l'albumine, HRBC, NO scavenger, l'œdème et la péritonite induites par la carragénine, MPO, l'infiltration des PN).

6.3 Évaluation de l'activité antioxydante et hépatoprotectrice

6.3.1 Marqueurs de l'hépatotoxicité

L'hépatotoxicité induite par (400 mg/kg) d'AVP durant 14 jours se manifesta par une augmentation des activités enzymatiques des ALT et AST hautement significative. L'administration des rats par une dose de (200 mg/kg) de l'extrait *n*-BuOH temporelise l'effet de l'AVP et normalise les valeurs des ALT (77,32%) et AST (76,44%). Ces valeurs pourraient être considérées comme comparables à celles de la vitamine E qui a réduit l'augmentation des ALT et AST à (86,43 et 80,06%) respectivement (figure 6.16).

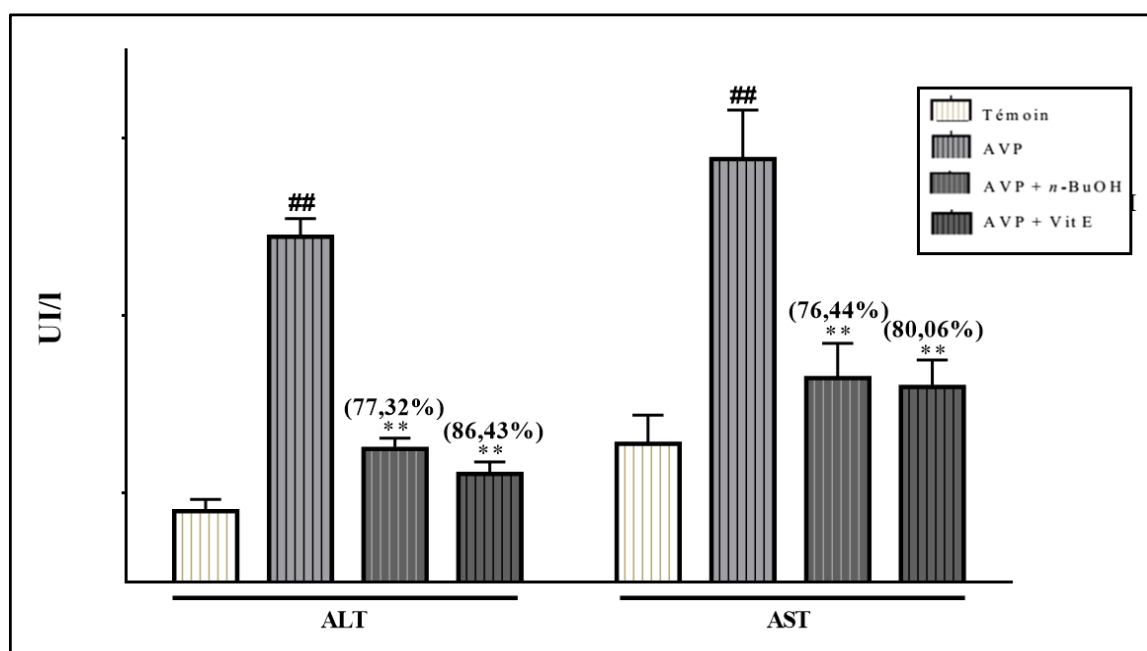


Figure 6.16: L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) sur le niveau sérique des enzymes ALT et AST dans le foie des rats traités par l'AVP (400 mg/kg). Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=6). Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=6). (##P < 0.01) différence significative par rapport au groupe témoin ; (**P < 0.01) différence significative par rapport au groupe AVP. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

L'administration d'AVP a provoqué une augmentation significative ($P < 0,01$) de LDH et d'ALP sériques. Le co-traitement des rats avec l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) a significativement ($P < 0,01$) corrigé la fuite de ces marqueurs enzymatiques hépatiques, ALP (73,86%), LDH (60,60%). Ces valeurs peuvent être considérés comme comparables à celles enregistrées avec la vitamine E, ALP (88,52%), LDH (84,81%) (figure 6.17).

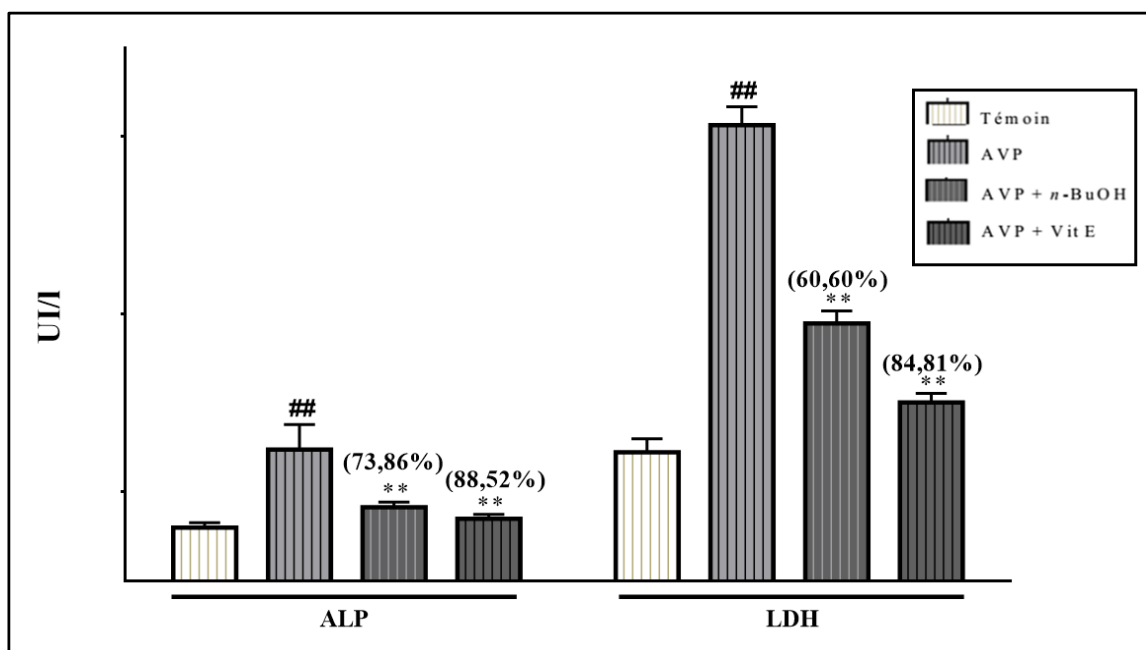


Figure 6.17: L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) sur le niveau sérique des enzymes ALP et LDH dans le foie des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=6). (## $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe témoin ; (** $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe AVP.

Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

Une augmentation significative au niveau de la bilirubine totale a été enregistrée chez les rats traités par l'AVP. Par ailleurs, l'administration de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) a permis de réduire cette concentration et de protéger les rats de cette fuite jusqu'à (52,29%). L'effet protecteur était plus efficace chez le groupe traité avec la vitamine E (200 mg/kg) en diminuant la concentration de la bilirubine jusqu'à (87,77%) (figure 6.18).

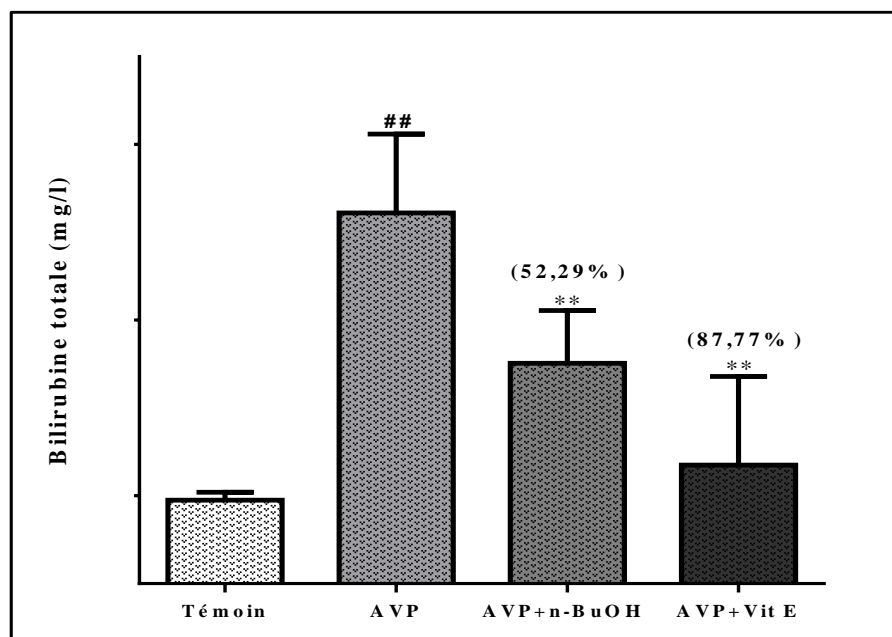


Figure 6.18: L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) sur le niveau sérique de la bilirubine totale dans le foie des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=6). (## $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe témoin ; (** $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe AVP.

Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

6.3.2 Évaluation de lipidogramme et steatose hépatique

La (figure 6.19) montre que le traitement des rats par l'AVP (400 mg/kg) durant 14 jours à induit une perturbation significative au niveau du lipidogramme. Cette altération se manifeste par l'augmentation des triglycérides sériques et hépatique (figure 6.19 A et B), du cholestérol-LDL (figure 6.19 D) et des lipides totaux (figure 6.19 E) et la diminution du cholestérol-HDL (figure 6.19 C). Le co-traitement des rats par l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) protège d'une manière significative ($P < 0,01$) cette hyperlipidémie induite par l'AVP en diminuant les triglycérides sériques et hépatique (78,66%, 58%), le cholestérol-LDL (70,27%), les lipides totaux (61,29%) et en augmentant le cholestérol-HDL (61,45%). Les valeurs de cette protection pourraient être considérées comme semblables à celles trouvées avec la vitamine E : les triglycérides sériques et hépatique (85,64%, 81,21%), le cholestérol-HDL (70,95%), les lipides totaux (77,42%) et le cholestérol-LDL (82,88%).

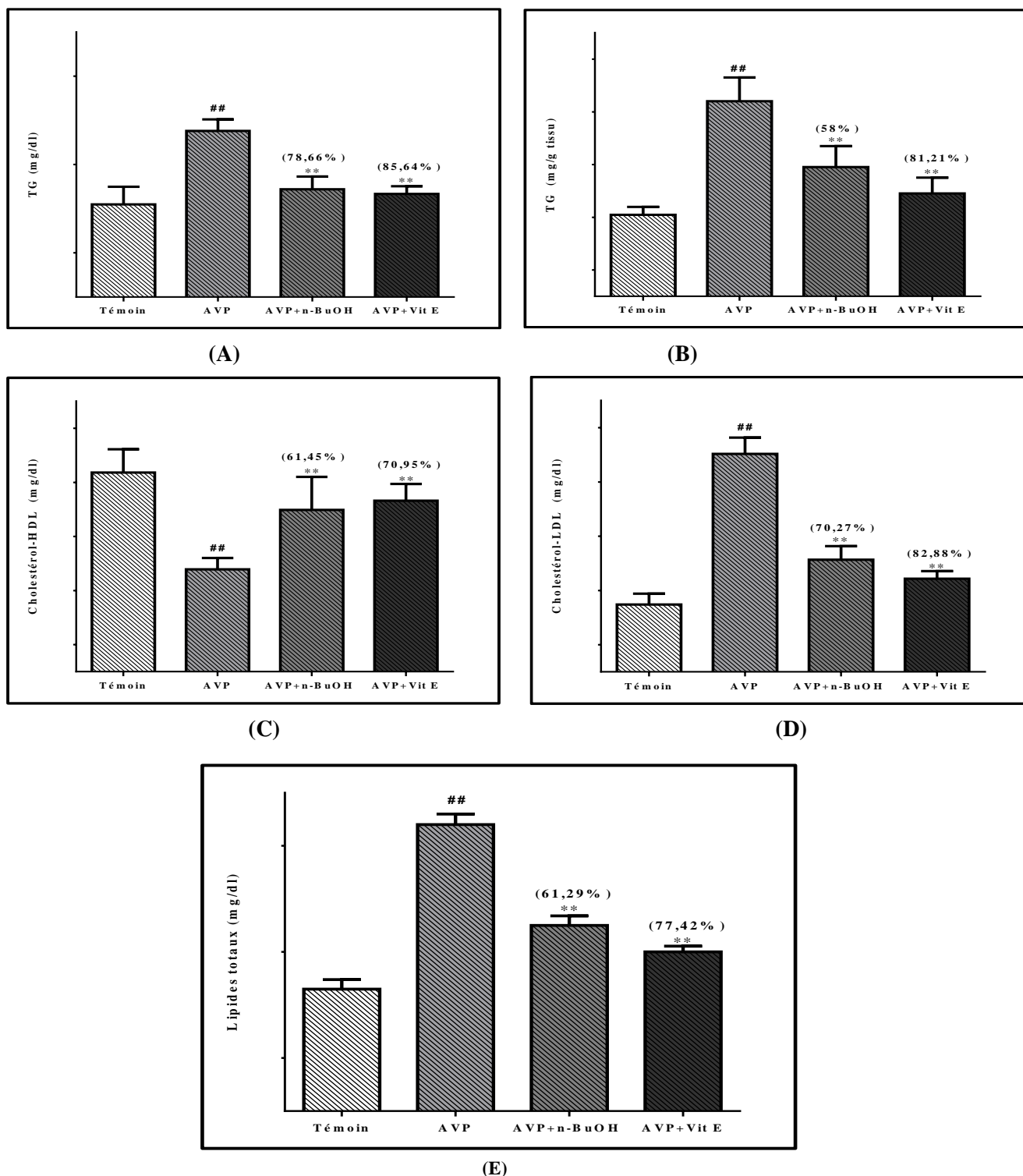


Figure 6.19: L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) sur le profil lipidique chez des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).

(A): Triglycérides (TG) dans le sérum; (B): Triglycérides (TG) dans le foie; (C): Cholestérol-HDL ; (D): Cholestérol-LDL; (E): Lipide totaux dans le sérum. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=6). (## $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe témoin ; (** $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe AVP. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition

6.3.3 Évaluation du statut oxydant cytosolique

6.3.3.1 La peroxydation lipidique

La (figure 6.20) montre que l'hépatotoxicité induite par l'AVP a provoqué une peroxydation lipidique traduite par une augmentation hautement significative du taux du MDA (TBARS) ($98,3 \pm 10$ nmol/g tissu). Le co-traitement des rats avec l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) par voie orale a diminué le taux de MDA jusqu'à (62,17%), un taux qui pourrait être considéré comme similaire à celui de la vitamine E (74,90%).

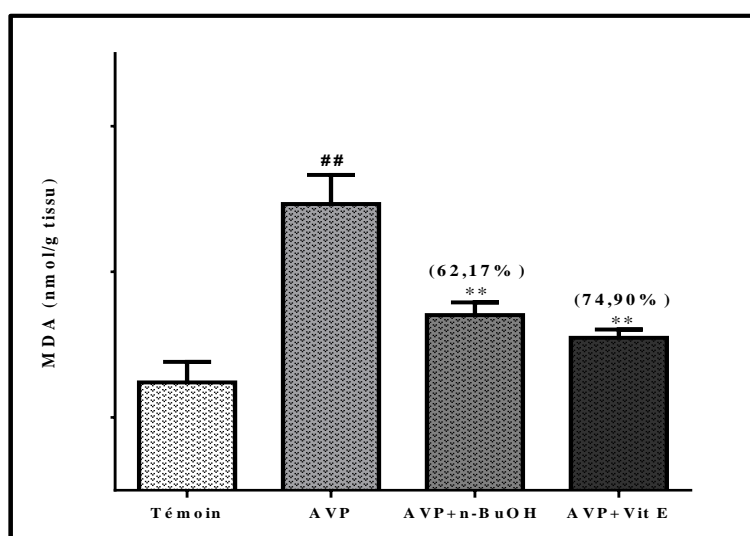


Figure 6.20: L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) sur le taux de MDA dans le foie chez des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n=6$). ($\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe témoin ; ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe AVP. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

6.3.3.2 Activité enzymatique de CAT et SOD cytosolique

L'activité enzymatique de la CAT et de la SOD dans le foie des rats recevant l'AVP (400 mg/kg) a significativement diminuée ($P < 0,01$) par rapport aux témoins qui ne reçoivent que la solution physiologique. L'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) a préservé l'activité de la SOD cytosolique jusqu'à (66,93%) et celle de la CAT cytosolique jusqu'à (67,13%). La vitamine E a permis de préserver l'activité de la CAT et de SOD chez rats traités par l'AVP par un pourcentage de (88%) et (78,26%) respectivement (figure 6.21).

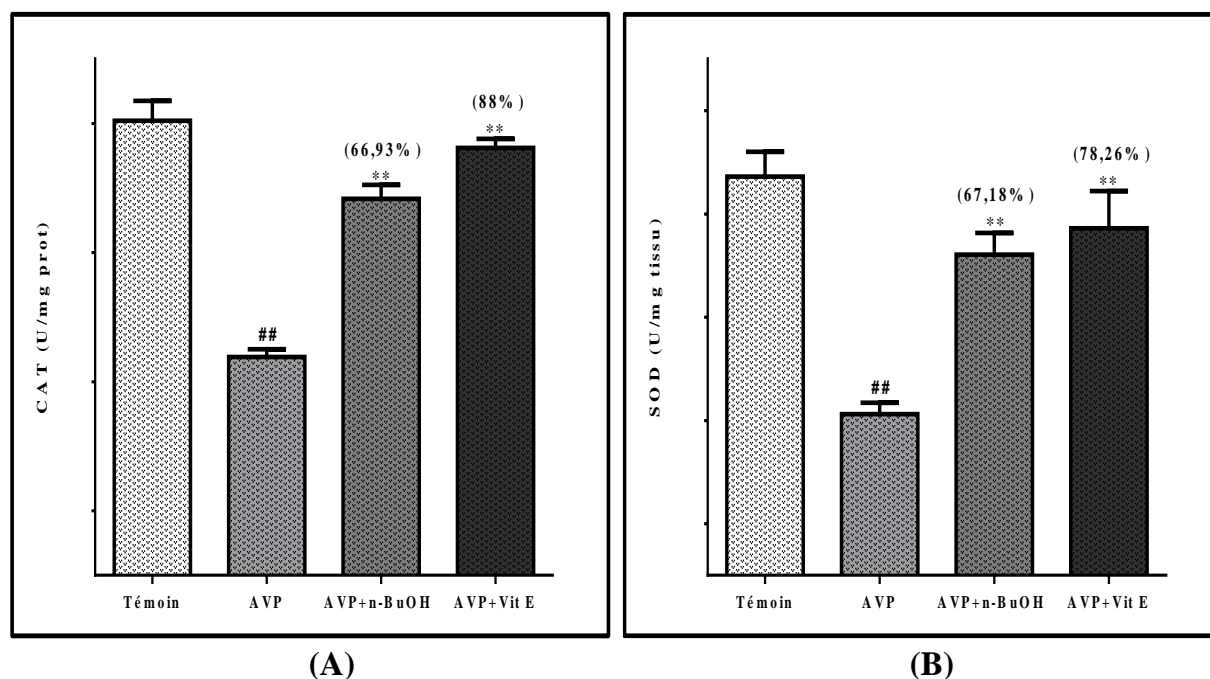


Figure 6.21: L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) sur l'activité des enzymes antioxydants. (A): CAT et (B): SOD dans le foie chez des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=6). (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe témoin ; (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe AVP. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

6.3.3.3 Activité enzymatique de système glutathion cytosolique

Le traitement des rats par l'AVP a provoqué clairement une déplétion du taux de GSH hépatique et a réduit les activités des enzymes liées au système-GSH à savoir le GST, le GR et le GPX (figure 6.22). Le co-traitement des rats avec l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) a corrigé d'une manière efficace le taux du GSH à (76, 59%) (figure 6.22 A) et a restauré les activités des enzymes du système-GSH, le GPx à (59, 39%) (figure 6.22 B), le GST à (51, 17%) (figure 6.22 C) et le GR à (47, 92%) (figure 6.22 C). Le rétablissement des paramètres de ce système antioxydant par l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) est semblable à celui observé dans le cas du traitement des rats par la vitamine E : GSH (86, 96%), GPx (66, 34%), GST (65, 16%), et GR (58, 44%) (figure 6.22 A, B, C, D).

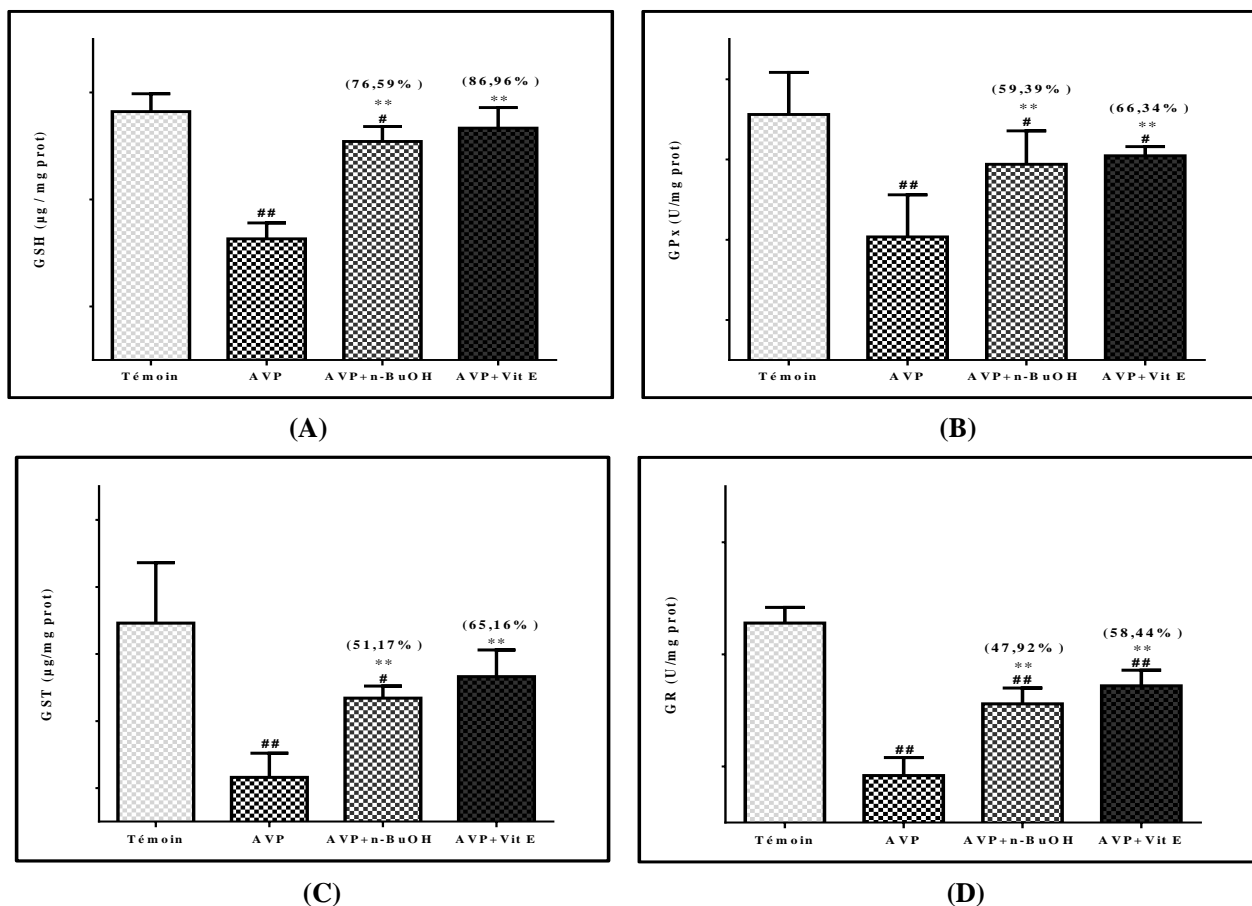


Figure 6.22: L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) sur le système glutathion cytosolique dans le foie chez des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=6). (#P < 0.05, ##P < 0.01) différence significative par rapport au groupe témoin ; (*P < 0.05, **P < 0.01) différence significative par rapport au groupe AVP. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

6.3.4 Étude histologique

La (figure (6.23)) montre que les photomicrographies du profil histopathologique du foie des rats traités par l'AVP ont manifesté des altérations sévères dans l'histoarchitecture, une infiltration des cellules inflammatoires mixtes, la présence d'une nécrose centrolobulaire accompagné de la présence de gouttelettes lipidiques reflétant une stéatopathie. Par contre, les lésions de foie de rats traités avec l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) et la vitamine E étaient moins sévères et l'architecture hépatique resta conservée d'une manière relativement semblable à celle des témoins.

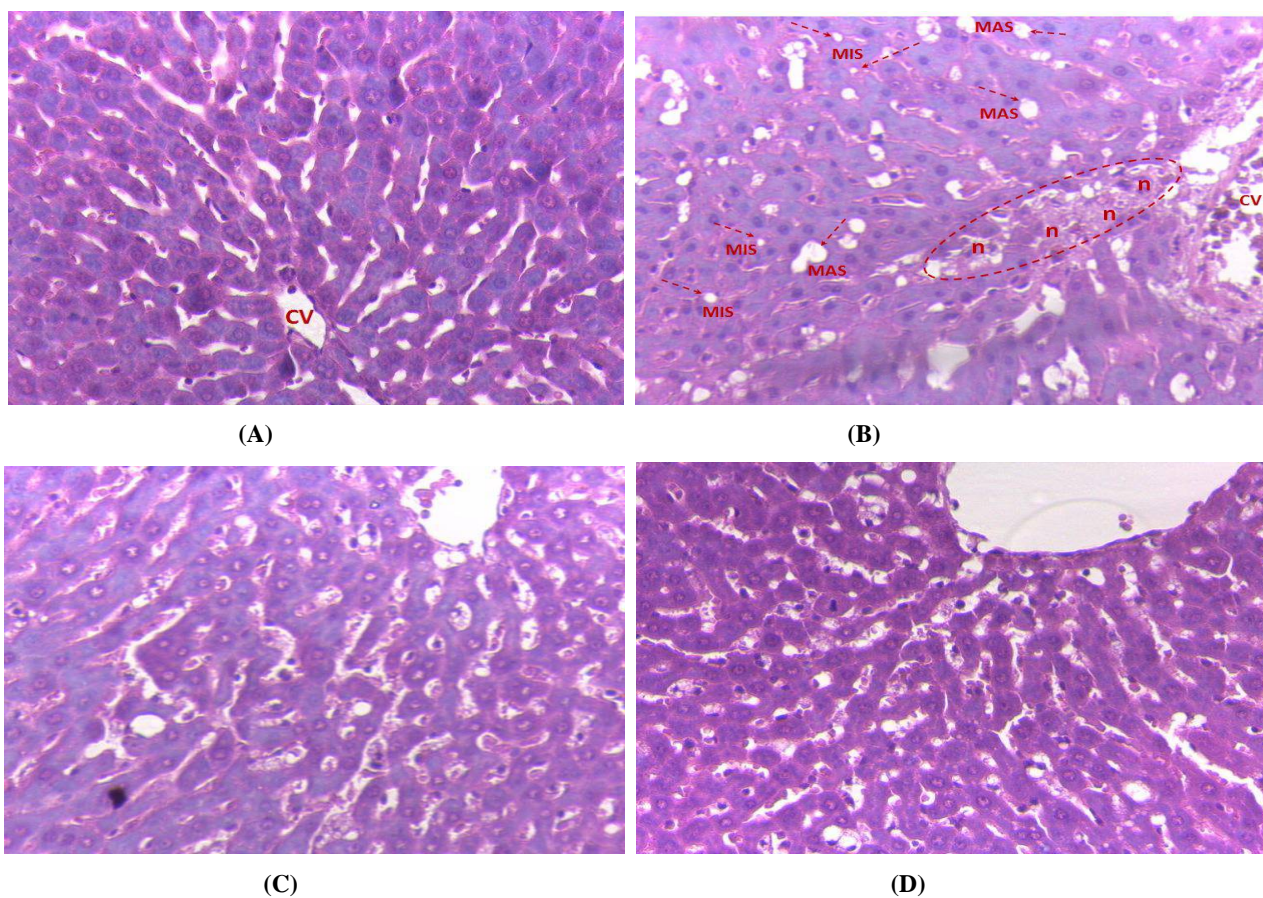


Figure 6.23: L'analyse histopathologique : l'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* vis-à-vis l'hépatotoxicité induite par l'AVP.

A (témoin) : architecture hépatique normale avec une veine centrale (CV) normale, des cordes radiées hépatocytaires; B (AVP) : chez les rats traités par l'AVP des altérations drastiques de l'histoarchitecture se traduit par (l'infiltration des cellules inflammatoires, présence des gouttelettes lipidiques au niveau du parenchyme. Les flèches rouges indiquent une stéatose microvésiculaire (MIS)/une stéatose macrovésiculaire (MAS) dominant la zone intermédiaire et une nécrose centrolobulaire; C (AVP + *n*-BuOH) : on peut remarquer une légère dégénérescence du parenchyme hépatique accompagnée d'une stéatose modérée; D (AVP + Vit E) : l'altération de l'architecture hépatocyttaire est moins sévère et on remarque des cordes hépatocytaires régulées.

6.3.5 Évaluation de l'effet des irridoides sur la lignée cellulaire (HepG2) traitée par l'AVP

6.3.5.1 Mesure de la viabilité cellulaire

D'après la (figure (6.24)) et la (figure (6.26)) on remarque que la viabilité cellulaire diminuée proportionnellement (96,44 - 88,12 - 84,06 et 63,02%) avec les concentrations (0,3 - 1 - 3 et 10 mM) respectivement de l'AVP par rapport aux cellules témoins non traitées qui présentent une viabilité de 100%. L'effet cytotoxique maximal de l'AVP (5,25%) est obtenu à la concentration de (30 mM).

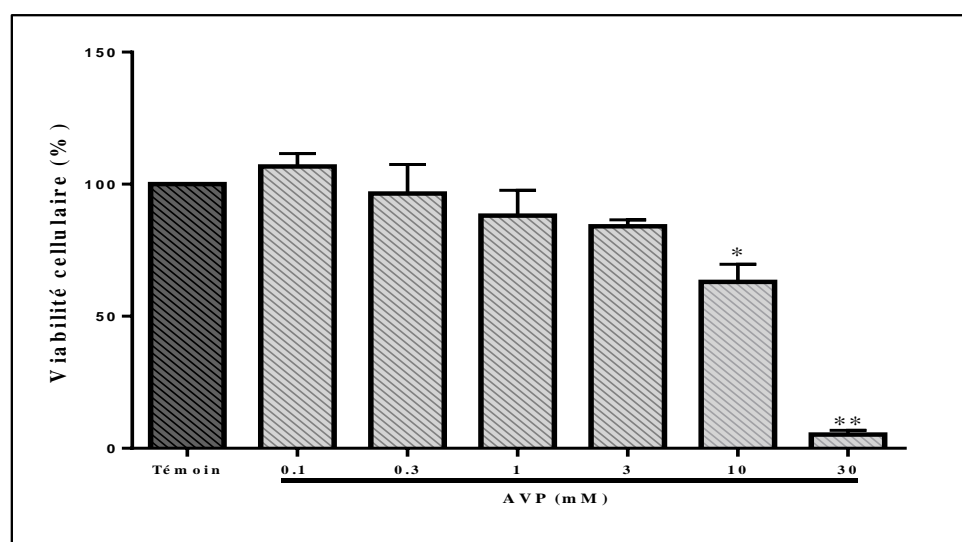
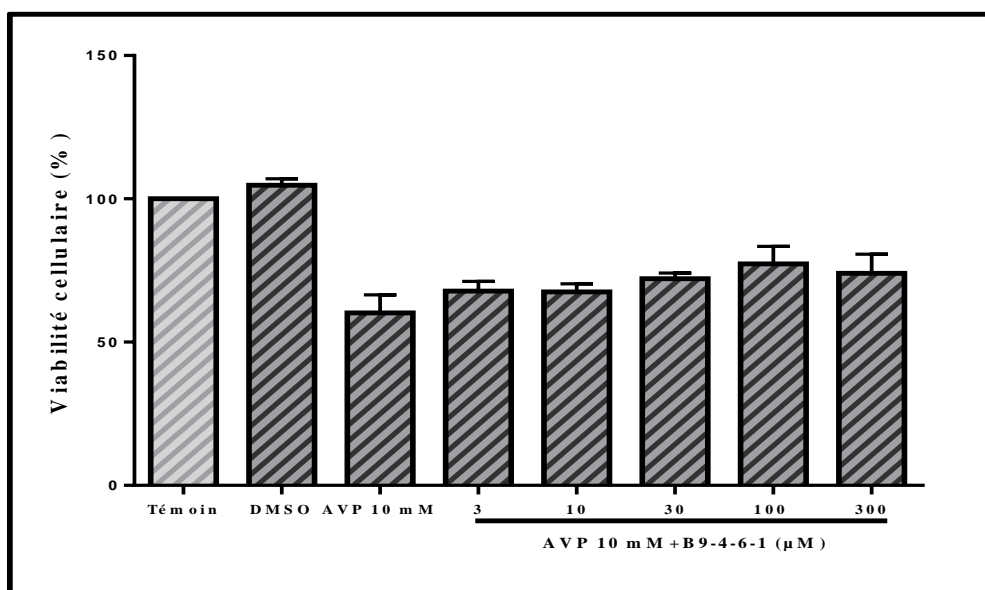


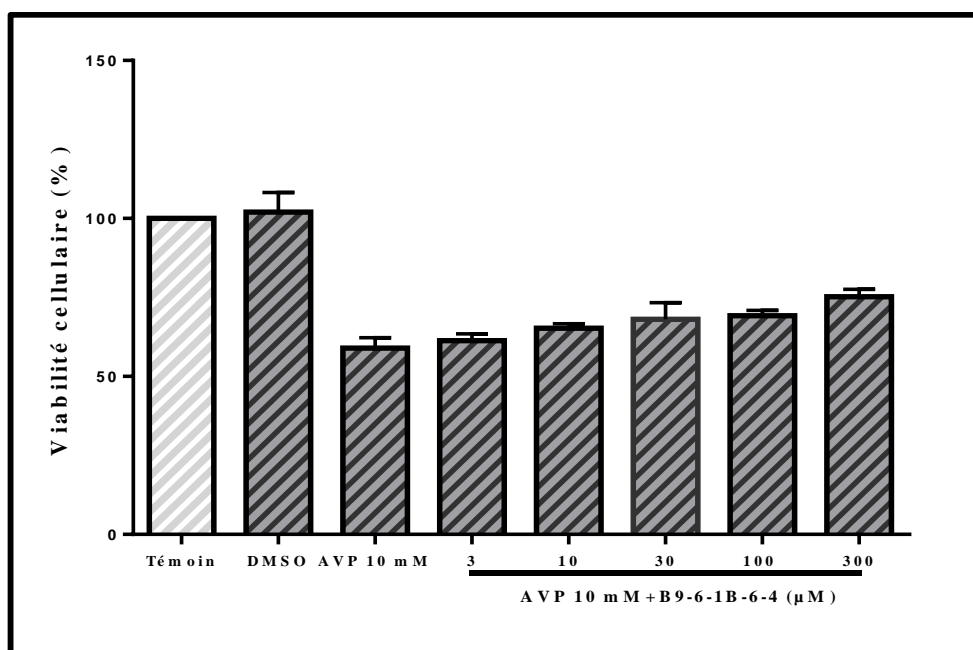
Figure 6.24: Etude de l'effet de concentrations croissantes d'AVP sur la viabilité cellulaire des cellules HepG2.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=3). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) différence significative par rapport au témoin.

Après l'incubation des cellules traitées par l'AVP à la concentration de (10 mM) dans un milieu de croissance normale (DMEM) en présence de différentes concentrations des molécules (B9-4-6-1 : 6-O-seneciolyantirrhinoside + 6-O-angeloylantirrhinoside et B9-6-1B- 6-4 : antirrhide) (3, 10, 30, 100 et 300 μ M) aucune différence significative est enregistré par rapport à celles obtenue avec les témoins et nous avons constaté que les deux molécules n'ont aucun effet protecteur remarquable contre la mortalité cellulaire induite par l'AVP (figure (6.25)) et (figure (6.26)).



(A)



(B)

Figure 6.25: Effet des molécules extraites de *n*-BuOH de *L. tingitana* sur la mortalité des cellules HepG2 induite par 10 mM d'AVP.

(A) B9-4-6-1 : 6-O-seneciolyantirrhinoside + 6-O-angeloylantirrhinoside; (B) : B9-6-1B-6-4 : antirrhide. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=3).

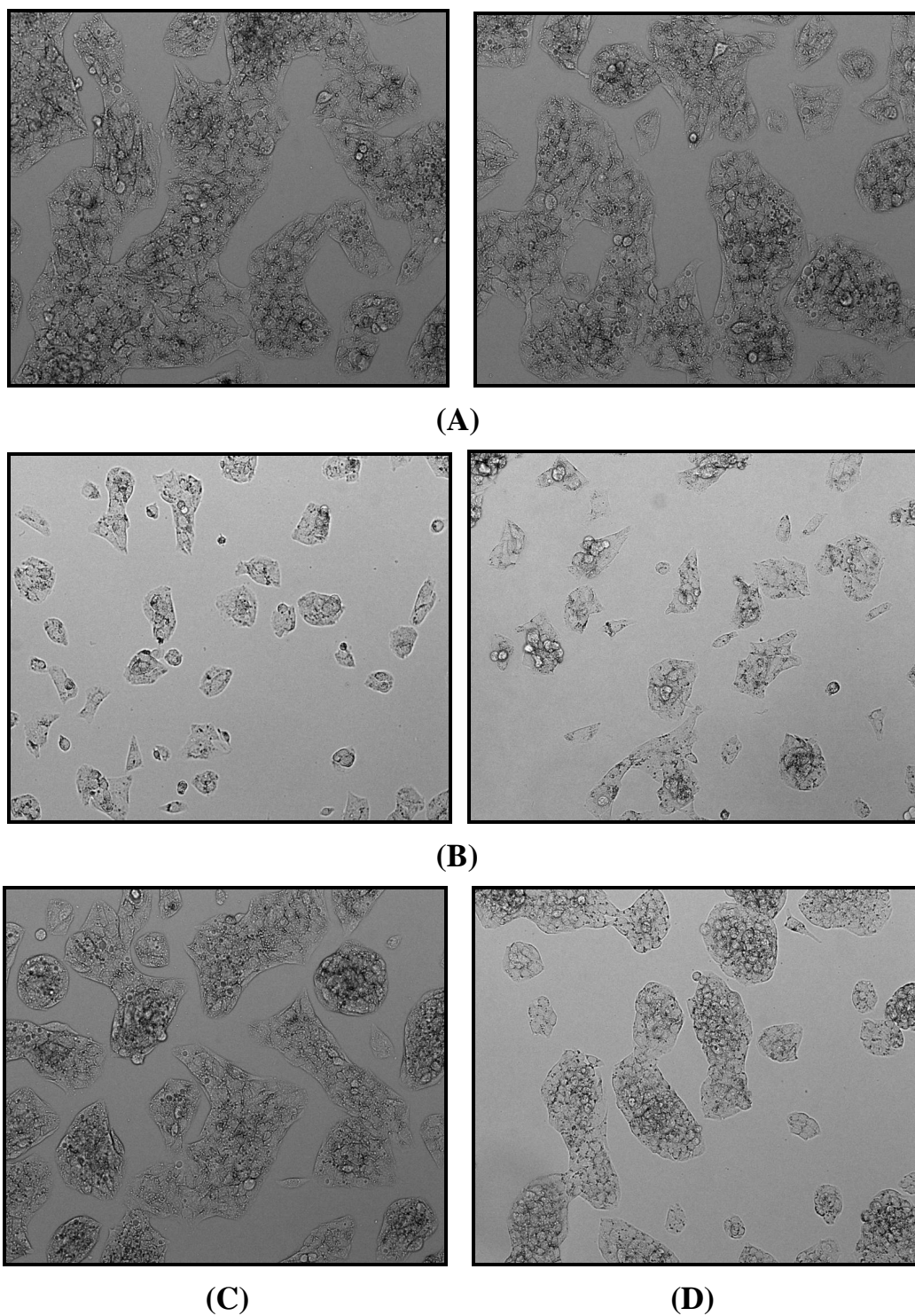


Figure 6.26: Effet des molécules extraites de *n*-BuOH de *L. tingitana* sur la mortalité des cellules HepG2 induite par 10 mM d'AVP.

(A) témoin; (B) : AVP 10 mM. (C) B9-4-6-1 : 6-O-seneciolyantirrhinose + 6-O-angeloylantirrhinose; (D) : B9-6-1B-6-4 : antirrhide.

6.3.5.2 Mesure de la production des espèces réactives de l'oxygène

La capacité de concentrations croissantes d'AVP à induire une production d'ERO a été déterminée sur les cellules HepG2 au moyen d'un composé fluorescent le carboxy-2',7'- dichlorofluorescin diacétate (carboxy-H₂DCFDA) et les résultats sont présentés dans la (figure 6.27). La production d'ERO a parallèlement été induite par un agent pro-oxydant l'H₂O₂ dans les mêmes conditions et les résultats sont présentés dans la (figure 6.28).

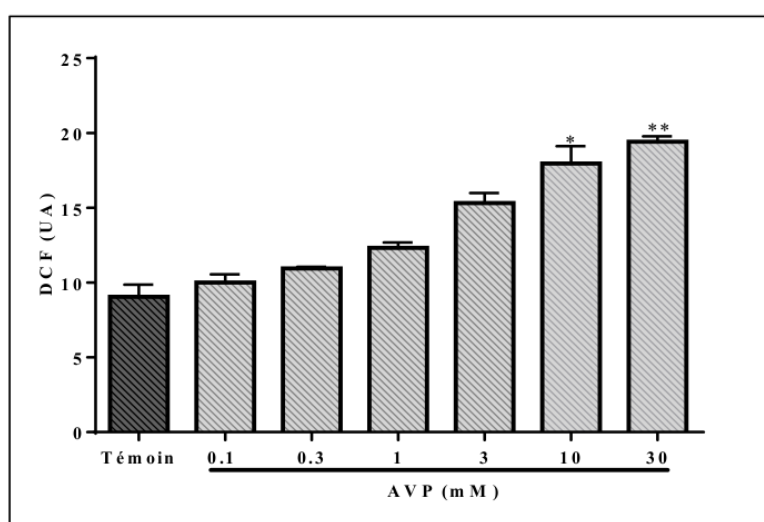


Figure 6.27: Mesure au moyen d'une sonde fluorescente, le carboxy-2',7'-dichlorofluorescin diacétate (carboxy-H₂DCFDA), de la production d'ERO induits par l'AVP sur les cellules HepG2. UA : unité arbitraire. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=3). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) différence significative par rapport au témoin.

Une production des ERO augmente proportionnellement (10,00, 10,93, 12,32, 15,31 et 17,96 UA) avec les concentrations (0,1, 0,3, 1, 3, 10 et 30 mM) d'AVP par rapport au témoin. L'effet maximal (19,41 UA) étant obtenu à la plus forte concentration (30 mM). En revanche l'effet inducteur d'ERO de l'AVP reste cependant plus faible que celui de l'H₂O₂ qui est très significatif. Les molécules (B9-4-6-1 : 6-O-seneciolyantirrhinoside + 6-O-angeloylantirrhinoside et B9-6-1B-6-4 : antirrhide) n'ont aucun effet protecteur vis-à-vis de la production des ERO induite par l'AVP (figure 6.27).

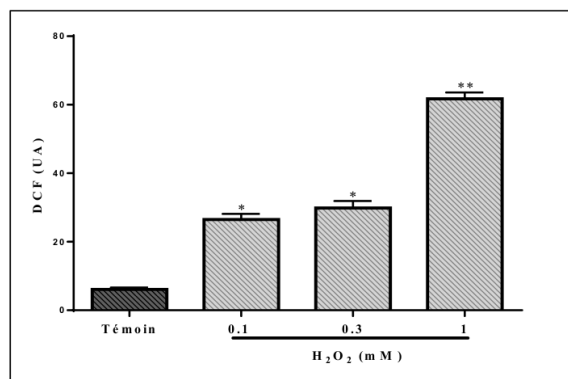
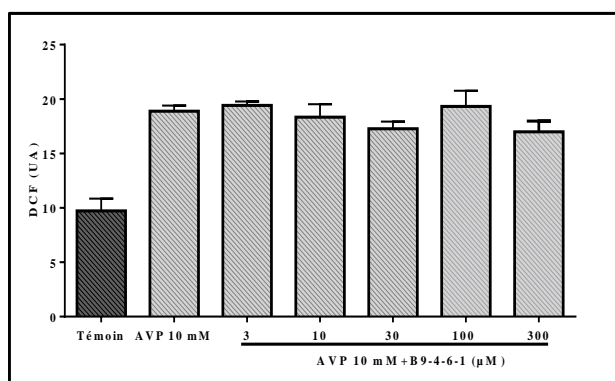


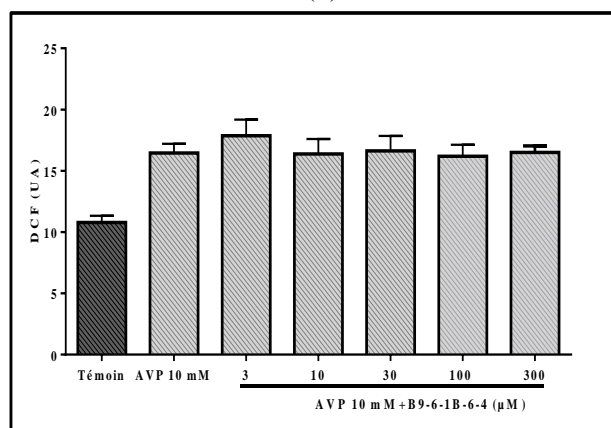
Figure 6.28: Mesure au moyen d'une sonde fluorescente, le carboxy-2',7'-dichlorofluorescein di-acétate (carboxy-H₂DCFDA), de la production d'ERO induits par l'H₂O₂ sur les cellules HepG2.

UA : unité arbitraire. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=3).

(* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$) différence significative par rapport au témoin.



(A)



(B)

Figure 6.29: Effet des molécules extraites de *n*-BuOH de *L. tingitana* sur la production des ERO induite par l'AVP sur les cellules HepG2.

(A) B9-4-6-1 : 6-O-seneciolyantirrhinoside + 6-O-angeloylantirrhinoside; (B) : B9-6-1B-6-4 : antirrhide. UA : unité arbitraire. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=3).

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) différence significative par rapport au témoin.

On peut conclure de cette partie que l'extrait n-BuOH à (200 mg/kg) a préservé la fonction hépatique en modulant la stéatose et en neutralisant le stress oxydant issus durant le traitement par l'AVP (400 mg/kg) à un degré comparable à celui de la vitamine E. Alors que les molécules antirrhides isolées n'arrivent pas à réduire l'effet toxique de l'AVP au niveau des lignées HepG2.

6.4 Évaluation du dysfonctionnement mitochondriale

6.4.1 Étude *in vitro* sur des mitochondries hépatiques isolées

6.4.1.1 Phosphorylation oxydative

L'étude de la phosphorylation oxydative a été réalisée en mesurant la consommation d'oxygène des mitochondries isolées du foie de rats en présence des substrats glucidiques (succinate/roténone, glutamate/malate et pyruvate) ou et d'un substrat lipidique (le palmitoyl-carnitine en présence de malate) (figure 6.30).

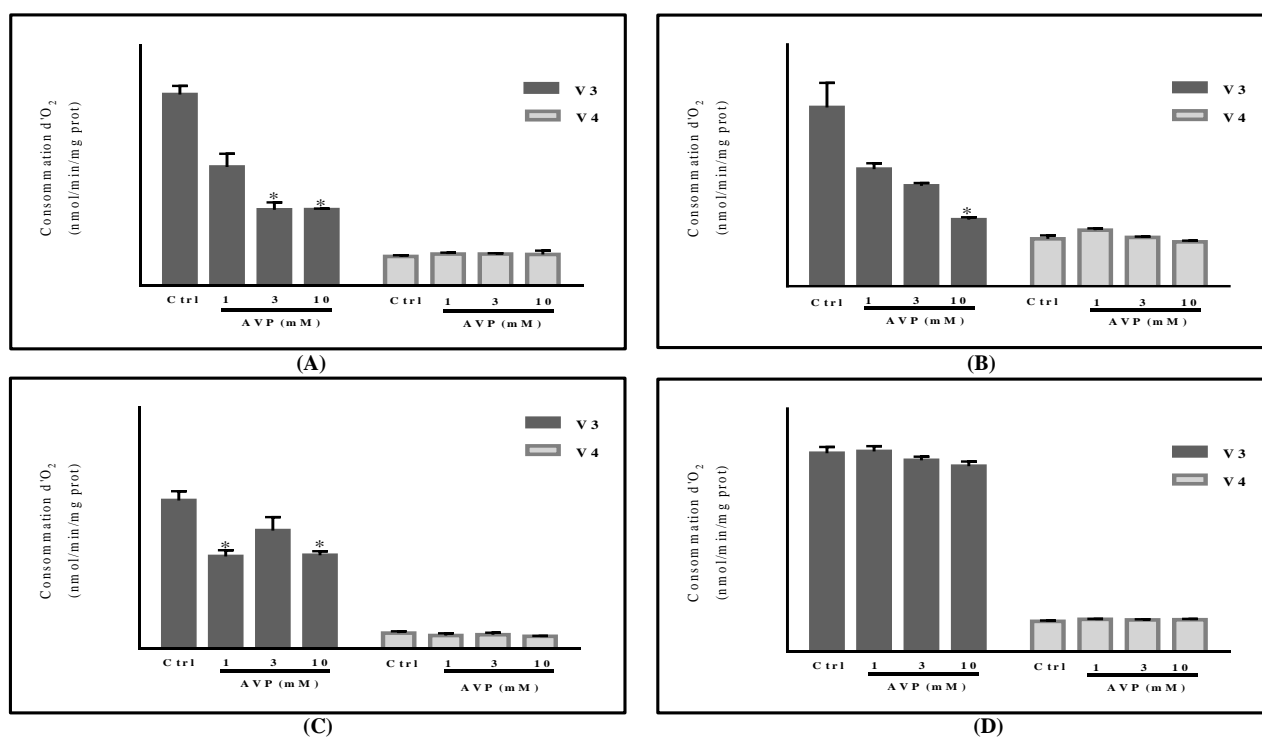


Figure 6.30: Mesure de la consommation d'oxygène.

(A): Palmitoyl-Carnitine/Malate; (B): Pyruvate; (C): Glutamate/Malate; (D): Succinate/Roténone. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=3). (* $P < 0.05$) différence significative par rapport au contrôle (Ctrl).

Les résultats obtenus montrent que l'AVP aux concentrations de (3 et 10 mM) inhibe significativement la consommation d'oxygène causée par la synthèse d'ATP (stade 3) en présence de palmitoyl-l-carnitine (60,29%) et (60,19%), de pyruvate (43,76%) et (62,75%) ou de glutamate/malate à (1 et 10 mM) (20,33%) et (37,05%), alors qu'il n'y a pas d'effet lorsque le

substrat est le succinate. En revanche, l'AVP ne modifie pas la consommation d'oxygène indépendante de l'ADP (stade 2).

La mesure des différents états respiratoires permet également de calculer le contrôle respiratoire (RCR) qui est égal à (V_3/V_4) . La (figure (6.31)) montre que l'AVP aux concentrations de (3 et 10 mM) inhibe de la consommation d'oxygène causée par la synthèse d'ATP (stade 3) en présence de palmitoyl-carnitine ce qui est associée à une diminution significative du RCR (62,37% et 60,52%). En présence de pyruvate la diminution du RCR n'est significative qu'à la concentration de (10 mM) (59,95%). Aucune diminution significative lorsque le substrat est le succinate. Une tendance à la diminution du RCR est observée en présence de glutamate aux concentrations de (1 et 10 mM) mais elle n'est pas significative.

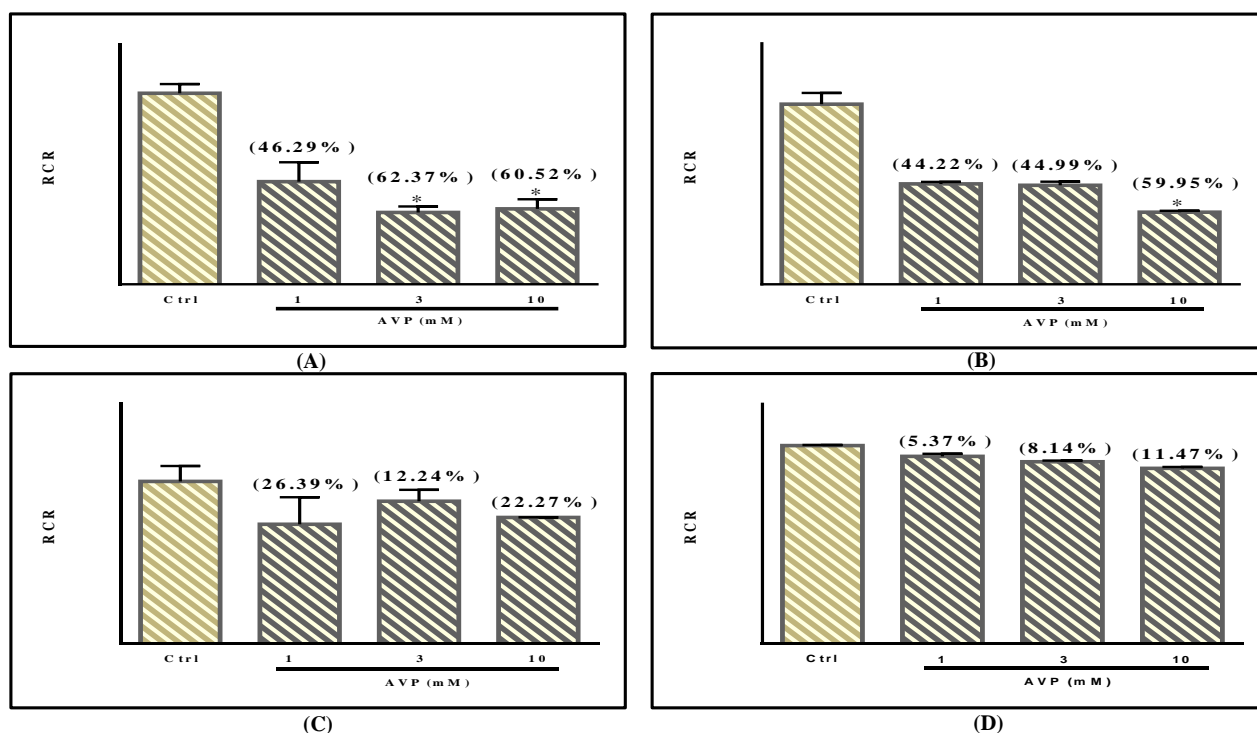


Figure 6.31: Effet de l'AVP sur le contrôle respiratoire (RCR).
 (A): Palmitoyl-Carnitine/Malate; (B): Pyruvate; (C): Glutamate/Malate; (D): Succinate/Roténone. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=3). (* $P < 0.05$) différence significative par rapport au contrôle (Ctrl).

L'utilisation de l'agent découpleur (FCCP) a également permis de montrer que la capacité maximale de consommation d'oxygène (stade 3') est inhibée par l'AVP par rapport aux témoins à la concentration de (3 mM) en présence des substrats (palmitoyl-carnitine, glutamate/malate et pyruvate) alors qu'aucun effet n'est enregistré en présence de (succinate/roténone) (figure (6.32)).

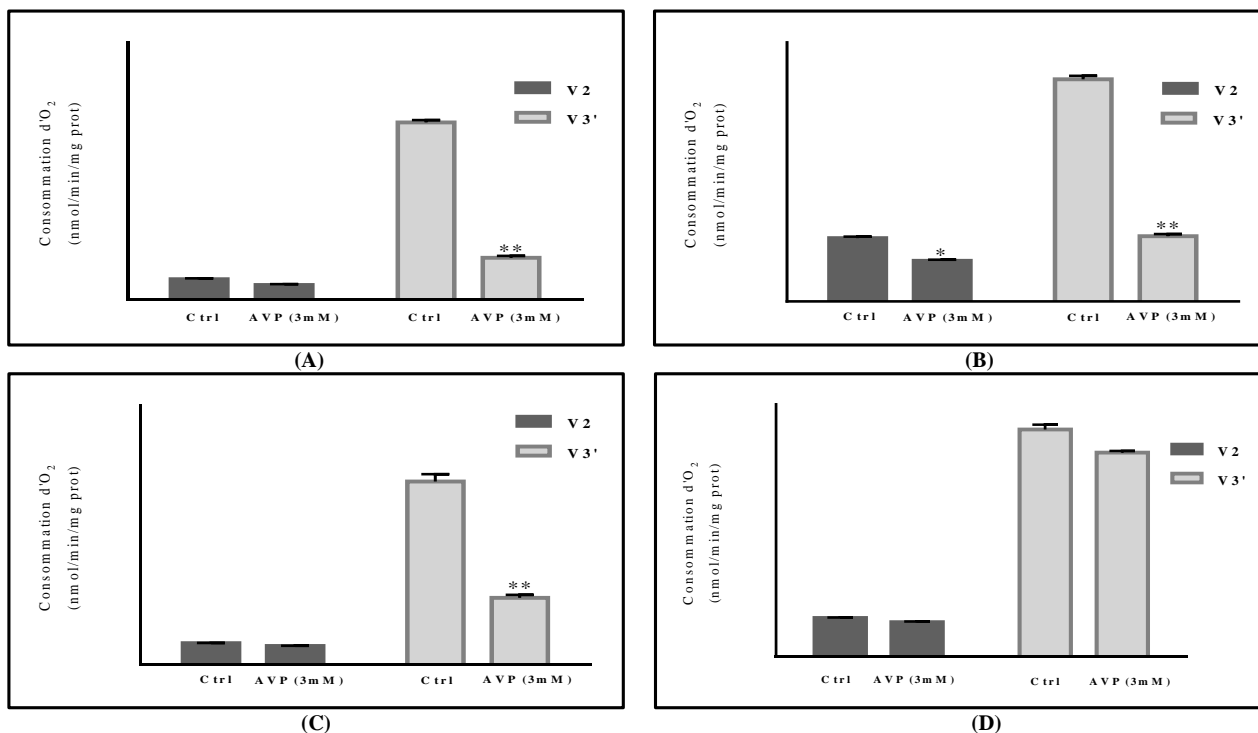


Figure 6.32: Mesure de la consommation d'oxygène en présence de FCCP. (A): Palmitoyl-Carnitine/Malate; (B): Pyruvate; (C): Glutamate/Malate; (D): Succinate/Roténone. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=3). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) différence significative par rapport au contrôle (Ctrl).

6.4.2 Activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale

Afin d'étudier le mécanisme d'inhibition de l'AVP sur la respiration mitochondriale, les activités des complexes de la chaîne respiratoire ont été mesurées sur des mitochondries isolées du foie de rat.

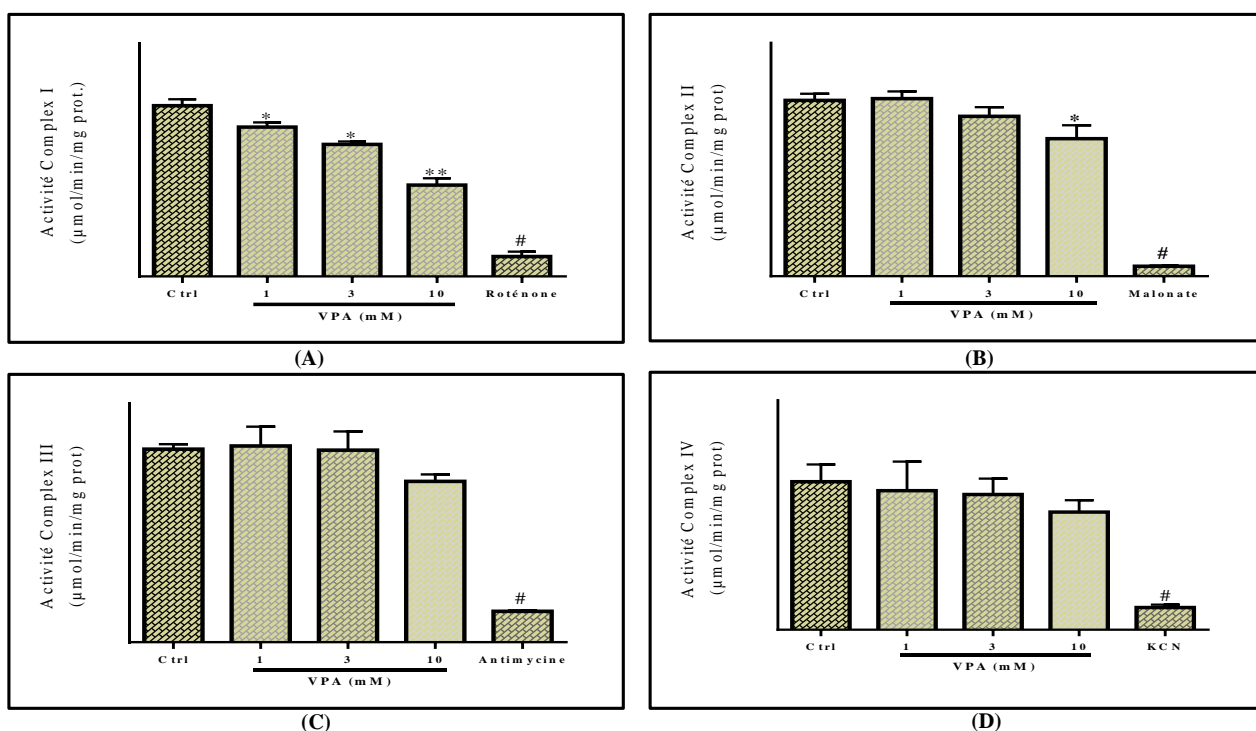


Figure 6.33: Mesure de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. (A): Complexe I; (B): Complexe II; (D): Complexe III; (E) Complexe IV. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=3). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P < 0.001$) différence significative par rapport au contrôle (Ctrl).

Les résultats montrent que l'AVP inhibe l'activité du complexe I de façon concentration dépendante avec un effet important à 10 mM. Un faible effet inhibiteur est aussi observé sur l'activité du complexes II tandis qu'aucun effet significatif n'a été observé sur l'activité des complexe III et IV (figure:(6.34),(6.35),(6.36)). begincenter

6.4.3 Production mitochondriale d'H₂O₂

Nos résultats montrent que l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* et les molécules (B9-4-6-1 : 6-O-seneciolyantirrhinoside + 6-O-angeloylantirrhinoside et B9-6-1B-6-4 : antirrhide) extraites de ce dernier inhibent la production d'ERO induite par le blocage des complexes I et III de la chaîne respiratoire par la roténone et l'antimycine.

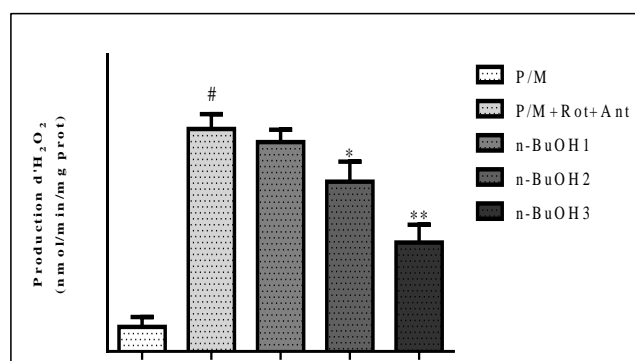


Figure 6.34: Mesure de la production mitochondriale d'H₂O₂ (1).

P/M: pyruvate/malate; P/M+ROT+ANT:pyruvate/malate+roténone+antimycine; *n*-BuOH1:pyruvate/malate+roténone+antimycine+10 μ g *n*-BuOH; *n*-BuOH2 : pyruvate/malate +roténone+antimycine+25 μ g *n*-BuOH; *n*-BuOH3:pyruvate/malate +roténone+antimycine+50 μ g *n*-BuOH. (# $P < 0.005$) différence significative par rapport au P/M. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) différence significative par rapport au P/M+Rot+Ant.

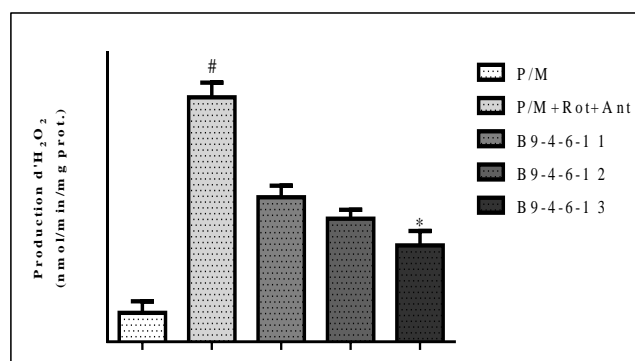


Figure 6.35: Mesure de la production mitochondriale de l'H₂O₂ (2).

P/M: pyruvate/malate;P/M+ROT+ANT:pyruvate/malate+roténone+antimycine; B9-4-6-1 1:pyruvate/malate+roténone+antimycine+10 μ M B9-4-6-1; B9-4-6-1 2 : pyruvate/malate +roténone+antimycine+25 μ M B9-4-6-1; B9-4-6-1 3:pyruvate/malate +roténone+antimycine+50 μ M B9-4-6-1. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) différence significative par rapport au P/M+Rot+Ant. (# $P < 0.005$) différence significative par rapport au P/M. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) différence significative par rapport au P/M+Rot+Ant.

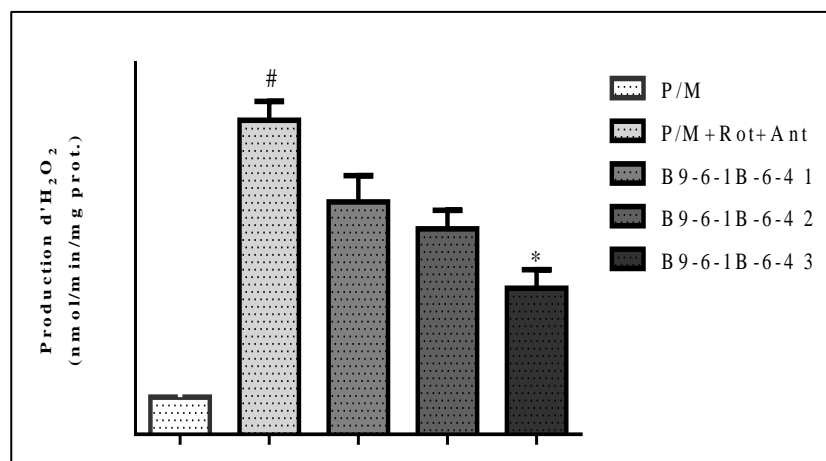


Figure 6.36: Mesure de la production mitochondriale de l'H₂O₂ (3).

P/M: pyruvate/malate; P/M+ROT+ANT:pyruvate/malate+roténone+antymicine;

B9-6-1B-6-4 1:pyruvate/malate+roténone+antymicine+10 μ M B9-6-1B-6-4; B9-6-1B-6-4 2 : pyruvate/malate +roténone+antimycine+25 μ M B9-6-1B-6-4; B9-6-1B-6-4 3:pyruvate/malate +roténone+antimycine+50 μ M B9-6-1B-6-4. (*P < 0.05, **P < 0.01) différence significative par rapport au P/M+Rot+Ant. (#P < 0.005) différence significative par rapport au P/M. (*P < 0.05, **P < 0.01) différence significative par rapport au P/M+Rot+Ant.

6.4.4 Évaluation du statut oxydant mitochondriale

Le statut oxydant mitochondrial a été évalué au niveau des mitochondries isolée de foie des rats co-traités par l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) et l'AVP (400 mg/kg).

Les rats traités par l'AVP ont présentent une déplétion du taux de GSH mitochondrial associée à une diminution significative des enzymes antioxydants SOD, GPx et accompagnée d'une augmentation significative du taux de MDA, marqueur de la peroxydation lipidique.

Le co-traitement des rats avec l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) a restauré d'une manière significative le taux du GSH à (59,63%) (figure 6.37 A), rétablit les activités des enzymes du système antioxydant, la SOD à (71,01%) (figure 6.37 C), le GPx à (55,69%) (figure 6.37 B); et réduit le taux de MDA à (64,29%) (figure 6.37 D).

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec le cas du co-traitement des rats avec la vitamine E : GSH (89,21%), GPx (65,76%), SOD (84,28%) et MDA (88,31%) (figure 6.37 A,B,C,D).

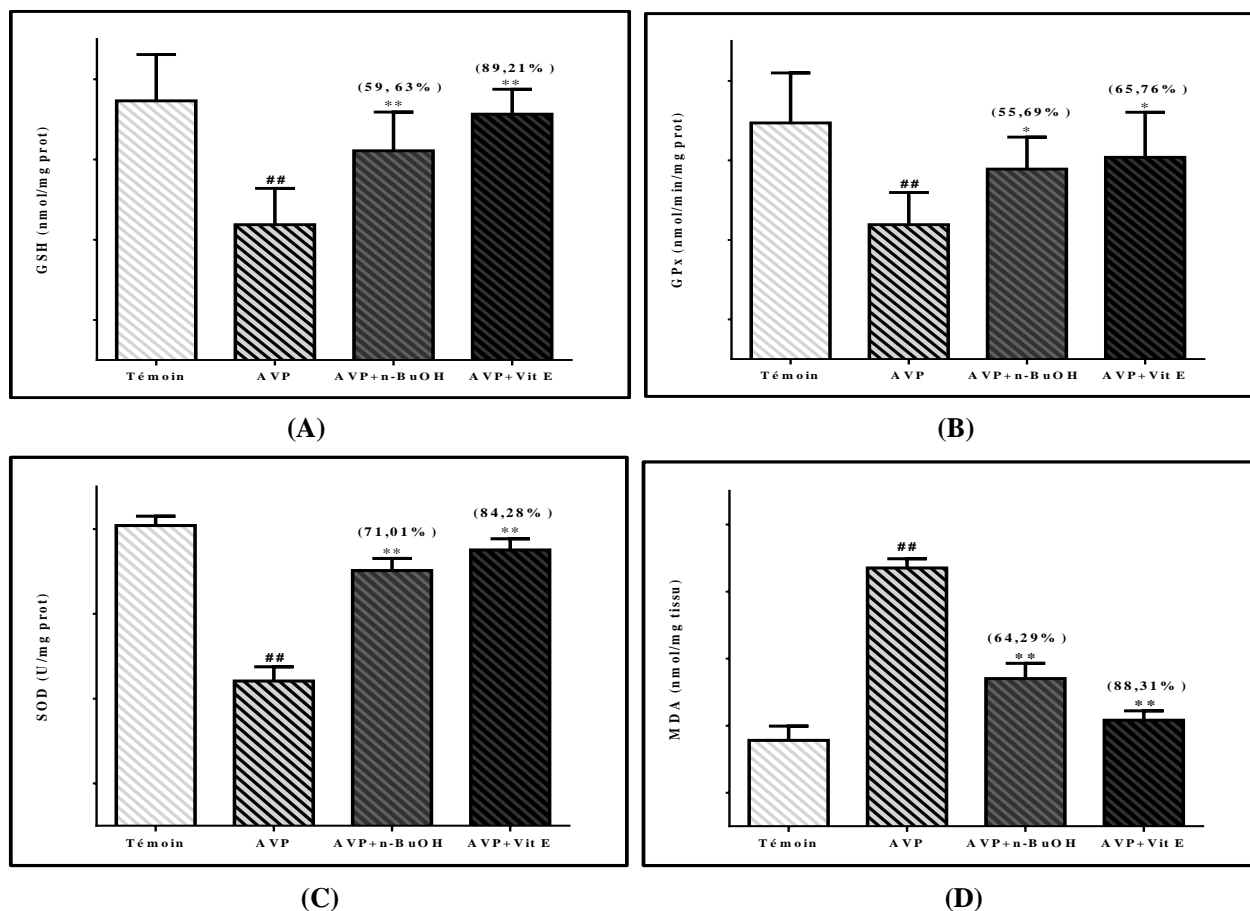


Figure 6.37: L'effet de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) sur la variation des taux de MDA et des enzymes antioxydants mitochondriale des hépatocytes chez les rats traités par l'AVP (400 mg/kg).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=6). (## $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe témoin ; (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe AVP. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

On conclue de cette partie que le dysfonctionnement mitochondrial se traduit par la diminution du taux de consommation d'oxygène au stade 3 dans les isolats mitochondriaux exposés à 3 mM d'AVP. A 10 mM, l'effet d'AVP devient plus prononcé sur le complexe 1. L'extrait n-BuOH ainsi que les molécules isolés ont pu réduire le (H₂O₂) mitochondrial. L'importance de l'extrait n-BuOH (200 mg/Kg) consiste énormément dans sa capacité à la réduire le stress oxydatif mitochondrial induit par l'AVP.

6.5 Évaluation du dysfonctionnement lysosomal

6.5.1 Évaluation du statut oxydant lysosomal

Les résultats de l'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) sur la variation des taux de MDA et de la SOD au niveau des lysosomes hépatocytaires chez les rats recevant de l'AVP (400mg/kg) sont illustrés dans la figure (6.38).

La figure (6.38) montre que le traitement des rats par l'AVP a provoqué un stress lysosomal hépatocytaire s'exprimant par une production significative de MDA et une diminution significative de la SOD lysosomale hépatocytaire. Ces changements ont pu être modulés sous l'effet de l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) qui a diminué le taux de MDA (71,09%) et augmenté l'activité de la SOD (69,44%). Les valeurs de cette modulation sont comparables à celles enregistrées dans le cas du traitement des rats par la vitamine E : MDA (78,01%), SOD (82,4%).

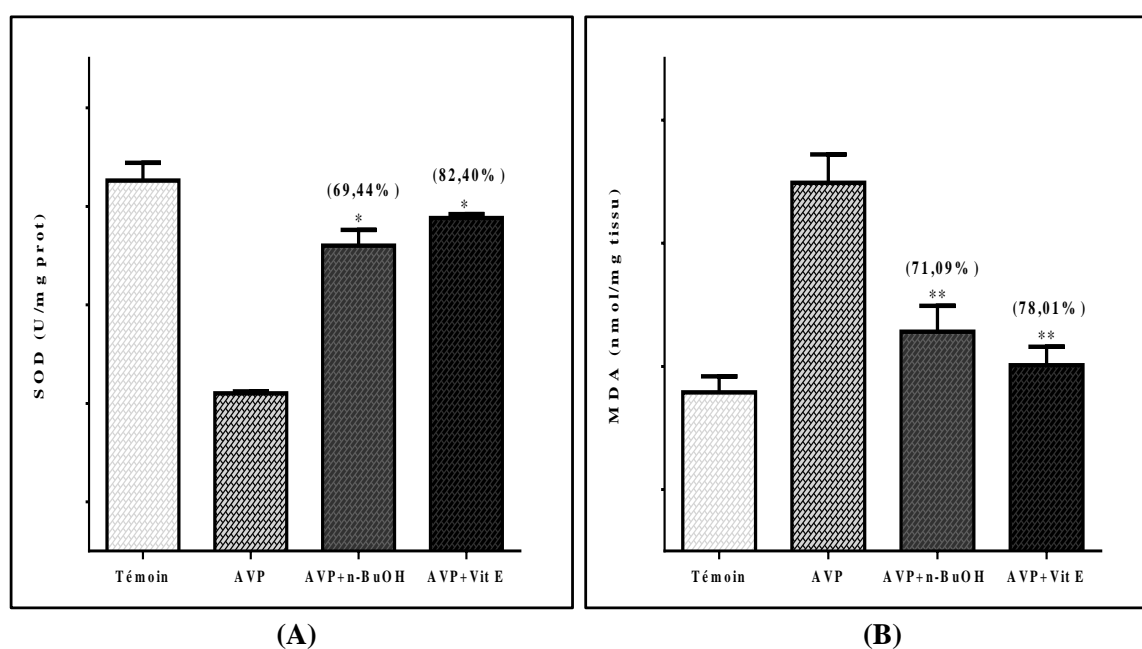


Figure 6.38: L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) sur la variation des taux de MDA et de SOD lysosomals dans les hépatocytes des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=6). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) différence significative par rapport au groupe AVP. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

6.5.2 Évaluation des enzymes lysosomales

La (figure (6.39)) montre l'effet de l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) sur la variation des activités des enzymes lysosomales hépatocytaires (ACP, β -NAG, cathepcine-D et β -GLU) et la MPO marqueur de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles (PN) chez les rats recevant l'AVP (400 mg/kg).

Les effets de l'AVP se répercutent sur les enzymes lysosomales du foie des rats. La (figure (6.39)) montre que l'AVP a induit une diminution significative de l'activité lysosomes : ACP, β -NAG, cathepcine-D et β -GLU et une augmentation significative de la MPO. Le co-traitement des rats avec l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) a amélioré d'une manière significative les activités de ces enzymes : l'ACP à (82,08%) (figure 6.39 A), la β -NAG à (80,75%) (figure 6.39 B), la cathepcine-D à (85,6%) (figure 6.39 C), la β -GLU à (79,16%) (figure 6.39 D) et a préservé la MPO à (81,66%) (figure 6.39 E). L'amélioration de ces enzymes par l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) est mieux remarquable par rapport à celle retenue dans le cas du traitement des rats par la vitamine E où les activités enzymatiques étaient successivement de l'ordre suivant de : l'ACP (63,29%), la β -NAG à (63,15%), la cathepcine-D à (65,6%), la β -GLU à (65,27%) et la MPO à (63,5%) (figure 6.39 A,B,C,D,E).

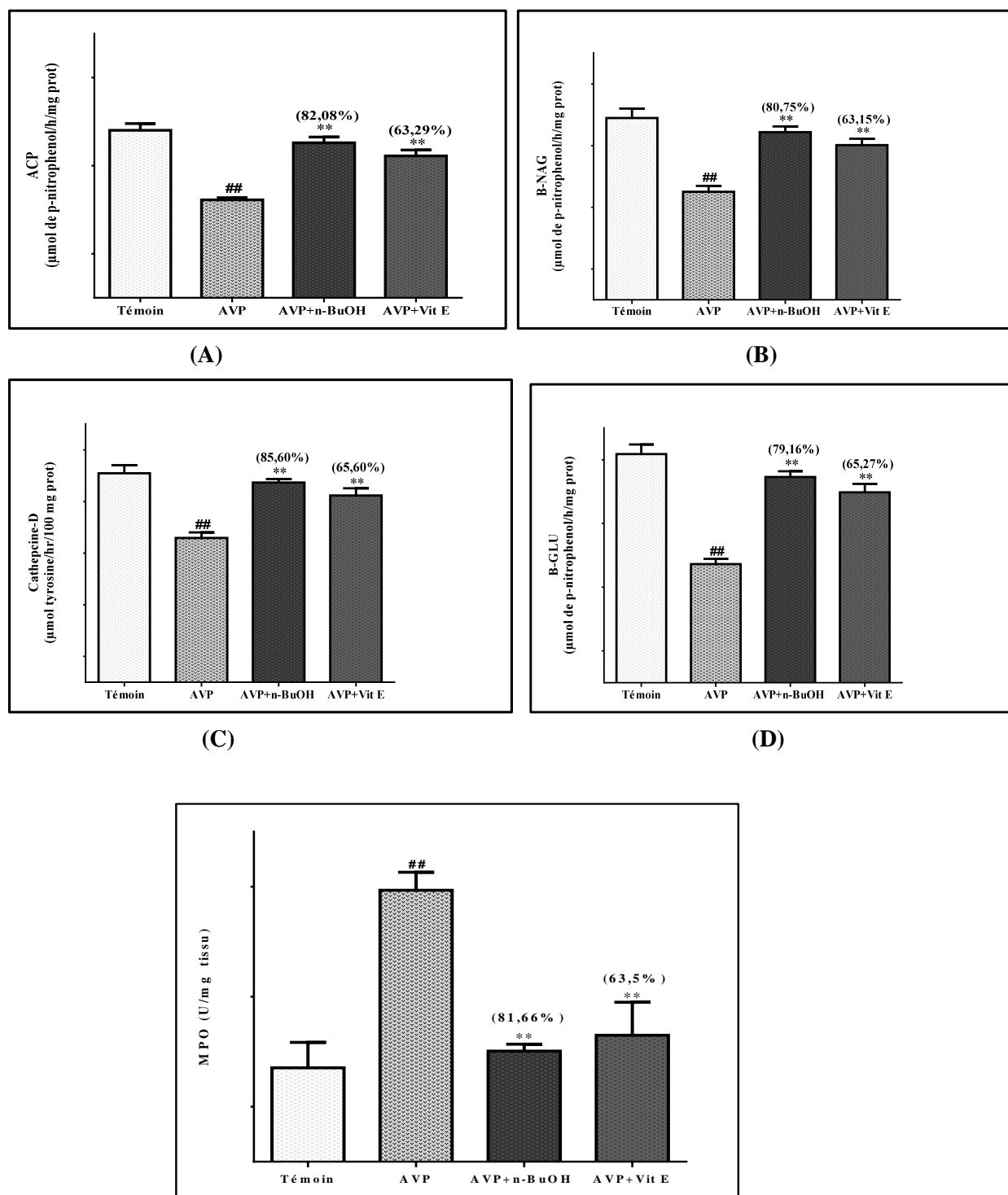


Figure 6.39: L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* (200 mg/kg) sur la variation des activités des enzymes lysosomales dans les hépatocytes des rats traités par l'AVP (400 mg/kg).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=6). (##P < 0.01) différence significative par rapport au groupe témoin ; (*P < 0.05, **P < 0.01) différence significative par rapport au groupe AVP. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

6.5.3 Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes

La capacité de concentrations croissantes d'AVP à induire une déstabilisation des membranes des lysosomes a été déterminée sur les cellules HepG2 au moyen d'un composé fluorescent, l'AO, par spectrofluorimétrie (figure 6.40). En parallèle, les cellules HepG2 sont traités avec de la LLoMe agent chimique induit une rupture des membranes lysosomales. A partir de (1 mM) l'AVP provoque une déstabilisation membranaire des cellules trèsb significative qui est maximale à la concentration (10 mM). Les résultats ont été très proche à ceux de la LLoMe.

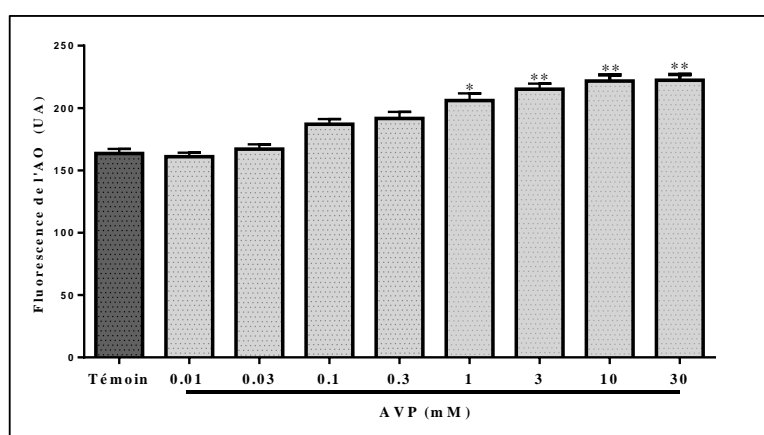


Figure 6.40: Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes induite par l'AVP sur les cellules HepG2.

UA : unité arbitraire. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=3).
 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) différence significative par rapport au témoin.

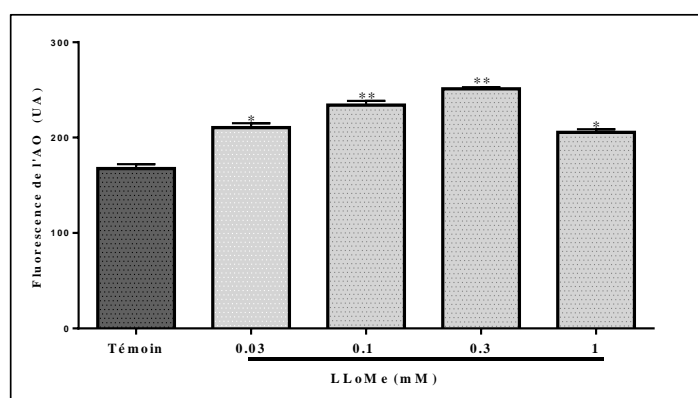
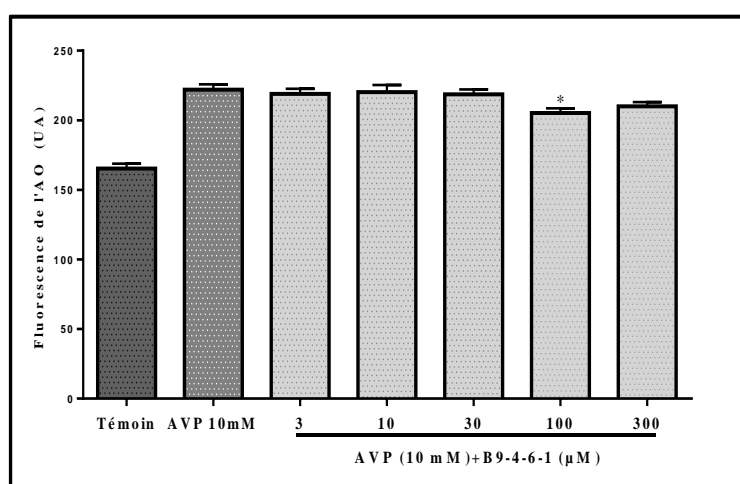


Figure 6.41: Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes induite par la LLoMe sur les cellules HepG2.

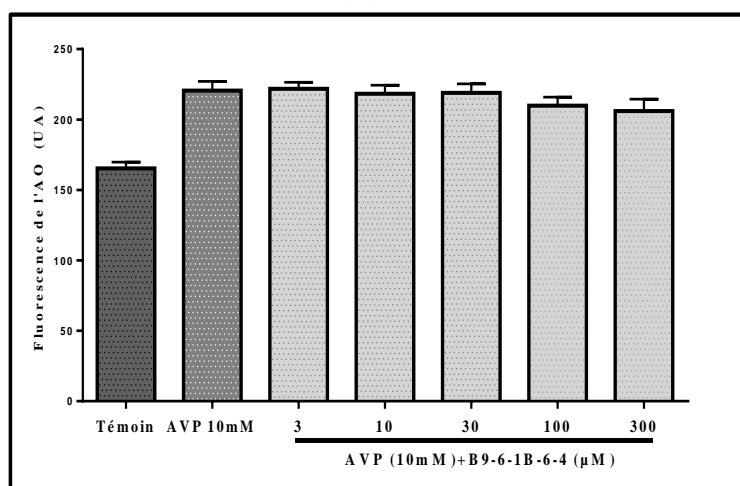
UA : unité arbitraire. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=3).
 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) différence significative par rapport au témoin.

Les molécules (B9-4-6-1 : 6-O-seneciolyantirrhinoside + 6-O-angeloylantirrhinoside et B9-6-1B-6-4 : antirrhide) n'ont aucun effet protecteur vis-à-vis de la destabilisation des membranes lysosomales induite par l'AVP (figure 6.42).

La (figure (6.42)) montre que une faible protection de l'intégrité membranaire lysosomale des cellules HepG2, manifestée par les molécules regroupées (B9-4-6-1 : 6-O- seneciolyantirrhinoside + 6-O-angeloylantirrhinoside), à (100 μM) pourrait être considérée comme modérée. La molécule B9-6-1B-6-4 n'a pu prouver aucun effet positif même à (300 μM).



(A)



(B)

Figure 6.42: Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes sur les cellules HepG2. (A): effet de la molécule (B9-4-6-1 : 6-O-seneciolyantirrhinoside + 6-O-angeloylantirrhinoside); (B) effet de la molécule (B9-6-1B-6-4 : antirrhide). UA : unité arbitraire. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=3). (* $P < 0.05$) différence significative par rapport au témoin.

L'AO s'accumule dans le compartiment lysosomal acide à cause du piégeage du proton. L'AO donne une fluorescence rouge (les lysosomes intacts utilisés comme contrôle) dans les compartiments très acides, tels les autophagolysosomes, où la forme protonée de l'AO s'accumule et manifeste une fluorescence rouge. Une fois les ruptures lysosomales s'expriment dans les lignées cellulaires HepG2 traitées avec l'AVP (10 mM), l'AO se transfère des lysosomes vers le cytosol où les fluorescents rouges vont être dispersés. ce résultat suggère que le contenu acide ait été moins libéré des endosomes ou des lysosomes vers le cytosol dans le cas des lignées cellulaires HepG2 traitées avec la molécule 1 (E) (figure (6.43)).

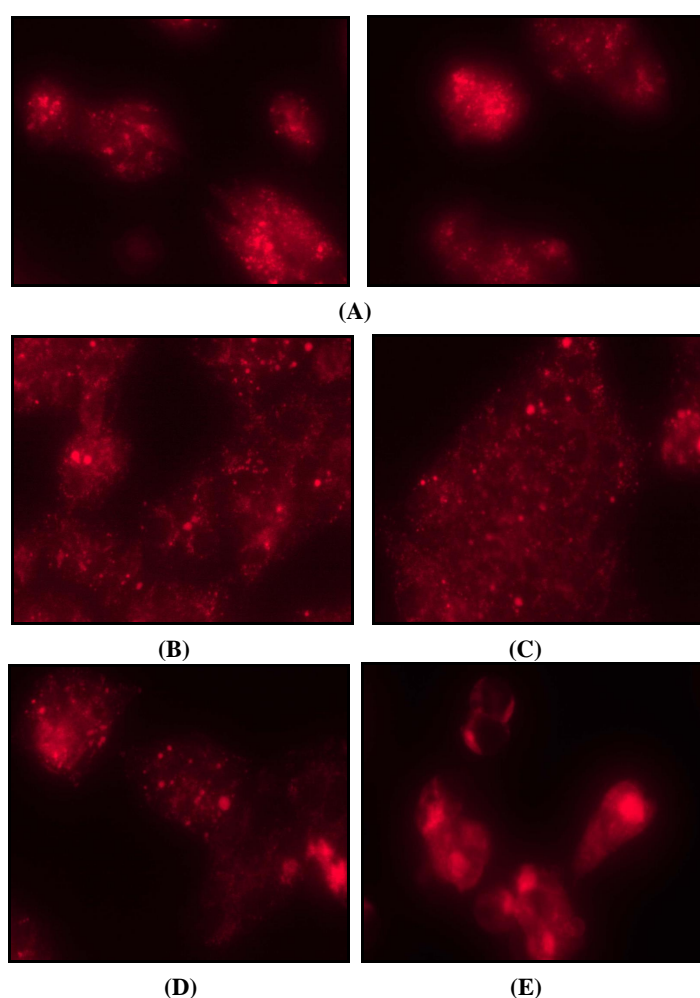


Figure 6.43: Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes sur les cellules HepG2. (A): témoin; (B): AVP; (C): LLoMe; (D):B9-6-1B-64: antirrhide; (E): B9-4-6-1:6-O-seneciolyantirrhinoside + 6-O-angeloylantirrhinoside.

On peut tirer de cette partie que l'extrait n-BuOH (200 mg/kg) a pu prouver une protection vis-à-vis le dysfonctionnement lysosomal, exprimé par une neutralisation importante du stress oxydant lysosomal chez les rat traités par l'AVP (400 mg/kg), et une préservation de l'intégrité membranaire limitant la fuite des enzymes lysosomales. Ces résultats sont mieux prononcés par rapport à la vitamine E utilisée comme contrôle positif.

Chapitre 7

Discussion

La compréhension de l'interaction des plantes médicinales avec la cascade d'événements délétères au sein des mitochondries et des lysosomes hépatocytaires induite par les médicaments et la découverte des sites où les substances bioactives exercent des effets modulateurs aidera à prévenir ou même à retarder l'apparition des complications liées au dysfonctionnement mitochondrial, lysosomal.

Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne notre travail a compris l'étude des effets modulateurs de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *L. tingitana* vis-à-vis le dysfonctionnement mitochondrial/lysosomal hépatocytaire induit par l'AVP en utilisant le rat *Albino wistar* comme modèle biologique.

Le screening phytochimique de *L. tingitana* a permis d'obtenir trois fractions différentes qui sont les phases EtOAc, *n*-BuOH et la phase CHCl₃. Les résultats obtenus révèlent que la fraction *n*-BuOH dont le rendement est le plus élevé, est la phase la plus riche en termes de polyphénols renfermant plus (45,98%) sous forme de flavonoïdes; le rendement des deux autres fractions est si faible.

Évaluation de l'activité antioxydante

L'étude de l'activité antioxydante de la plante *L. tingitana* est basée sur sa capacité à éliminer les ERO et les ions métalliques en servant de tests *in vitro*.

En présence d'un agent antioxydant, le DPPH° forme un radical libre de couleur violette stable en obtenant un autre atome d'électron ou d'hydrogène de l'antioxydant et le transforme en α - α -diphényl- β -picryl hydrazine incolore [1]. L'activité anti-radicalaire des trois fractions a été évaluée par la diminution du taux de DPPH° en présence des extraits à différentes concentrations. La phase AcOEt a prouvé l'effet scavenger le plus remarquable vis-à-vis le DPPH°, en comparaison avec la phase *n*-BuOH et la phase CHCl₃. Ce résultat correspond à la nature des flavonoïdes renfermés dans chaque phase, les flavonoïdes dans la phase butanolique sont généralement de nature glycosylée, par contre, ceux de la phase acétate sont des aglycones. La capacité à éliminer les radicaux DPPH° formés suggère que ces extraits pourraient être des donneurs d'électrons et réagir avec les ERO en les convertissant en produits plus stables mettant un terme à la chaîne des réactions radicalaires. Ceci révèle la diversité qualitative et quantitative des composés antioxydants contenus dans cette plante.

La capacité chélatrice des extraits dépend de la présence d'agents réducteurs présentant un potentiel antioxydant inhibant la formation du complexe Fe (II)-Ferrosine via la capture des ions (Fe²⁺) avant qu'ils réagissent avec d'autres molécules de l'environnement cellulaire [2]. L'effet chélateur de la fraction EtOAc est le plus marquant comparativement à la fraction *n*-BuOH et la fraction CHCl₃; cet effet est proportionnel à la nature qualitative et quantitative des trois fractions. Ceci indique aussi la richesse quantitative et qualitative de *L. tingitana* en termes de composés antioxydants. Des études précédentes suggèrent que les extraits obtenus par des solvants organiques polaires (acétone et méthanol) sont potentiellement plus actifs que ceux obtenus par des solvants organiques apolaires (chloroforme et éther de pétrole) et que la distribution des principes à activité antioxydante entre les différentes fractions dépend de la polarité des systèmes utilisés lors de l'extraction [3]. Ceci pourrait nous soutenir de supposer que les substances polaires (flavonoïdes) présents dans la phase EtOAc sont responsables de son activité antioxydante la plus importante [4].

Le test β -carotène mesure le potentiel d'inhibition la formation des hydroperoxydes diène conjugués résultant de l'oxydation de l'acide linoléique [5]. La cinétique du blanchissement du β -carotène montre que l'extrait *n*-BuOH inhibe d'une manière significative ($p \leq 0,05$) l'oxydation de l'acide linoléique. L'effet antioxydant de l'extrait *n*-BuOH exercé se traduit par le transfert des atomes d'hydrogène aux peroxydes formés au cours de l'oxydation de l'acide linoléique et les convertit en hydroperoxydes ce qui prévient l'oxydation et le blanchissement de β -carotène [6]. Cet effet antioxydant de l'extrait peut présenter un intérêt biologique en l'utilisant pour empêcher l'oxydation des lipides dans les membranes cellulaires [7].

Dans le test du pouvoir réducteur de fer l'activité antioxydante de l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* a été évaluée par spectrophotométrie en suivant l'augmentation d'absorbance accompagné d'un virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}). Cette élévation d'absorbance témoigne la présence des composés dotés d'une propriété antioxydante pouvant servir comme donneur d'électron qui réduit les ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}) [8]. Des études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle [9].

La capacité de piégeage du (NO) montre aussi une bonne activité anti-radicalaire de l'extrait *n*-BuOH, ce qui confirme la présence des composés qui jouent un rôle scavanger contre le (NO) produit dans le milieu pour l'inhiber de réagir avec l'oxygène. Cet effet de l'extrait peut ainsi présenter un intérêt biologique dans les processus pathologiques inflammatoires par sa capacité à éliminer l'oxyde nitrique [10].

Les résultats des différents tests précédents indiquent l'existence d'une multitude de mécanismes antioxydants simultanés caractérisant la plante *L. tingitana*. Ceci est en adéquation avec d'autres études travaillant sur d'autres espèces [2,5,6,11] et permet d'insister sur l'intérêt pharmaco-thérapeutique et préventif de cette espèce.

Références bibliographiques

- [1] Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan J Nutr.* 1986; 44:307-315.
- [2] Dinis TC, Maderia VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 315:161-169.
- [3] Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998; 56:317-333.
- [4] Çakir A, Mavi A, Kazaz C, Yildirim A. Antioxidant activities of the extracts and component of *Teucrium orientale* L. var. orientale, *Turk J Chem.* 2006; 30:463-494.
- [5] Kadri A, Zarai Z, Békir A, et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *Afr J Biotechnol.* 2011; 10:3908-3914.
- [6] Liu H, Mou Y, Zhao J, et al. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules.* 2010; 15:7933-7945.
- [7] Baghiani A, Boumerfeg S, Belkhiri F, et al. Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L extracts grow wild in Algeria flora. *Communicata Scientiae.* 2010; 1:128-136.
- [8] Gordon MH. The mechanism of the antioxidant action *in vitro*. In: *Food antioxidants*, Hudson BJB (Ed): London, Elsevier. 1990; 1-18.
- [9] Jeong SM, Kim SY, Kim DR, et al. Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J Agric Food Chem.* 2004; 52:3389-3393.
- [10] Sreejayan N, Rao MN. Nitric oxide scavenging by cucuminoids. *J Pharm Pharmacol.* 1997; 49:105-107.
- [11] Mansouri A, Ennbarek G, Kokkalou E, Kefalas P. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry.* 2005; 89:411-420.

Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'inflammation aiguë est un processus physiopathologique caractérisé par des symptômes classiques, tels la fièvre, la rougeur, le gonflement et la douleur [1]. Dans certaines maladies arthritiques et inflammatoires la dénaturation des protéines pourrait être due à la production des auto-antigènes [2]. Dans cette étude les résultats montrent que l'extrait *n*-BuOH possède un effet anti-inflammatoire se traduit par l'inhibition de la dénaturation des protéines induite par la chaleur. L'effet était comparable à celui du diclofénac anti-inflammatoire classique, utilisé comme référence [3].

La stabilisation de la membrane lysosomale est importante pour limiter la réponse inflammatoire en empêchant la libération du contenu lysosomal et des neutrophiles, y compris les enzymes bactéricides et les protéases qui provoquent une inflammation et des dégâts tissulaires supplémentaires. L'activité extracellulaire de ces enzymes est liée à une inflammation aiguë ou chronique [4].

La fragilité osmotique des érythrocytes dépend des changements structuraux spécifiques de leurs membranes. La protection de la lyse membranaire induite par l'hypotonie est prise comme une mesure *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire, car la composition membranaire des érythrocytes est similaire à celle de la membrane lysosomale [4]. Les résultats de la présente étude montrent que l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* a une activité anti-inflammatoire intéressante sur la stabilité des membranes des érythrocytes en inhibant l'hémolyse induite par l'hypotonie. Cette activité est comparable à celle de diclofénac qui agit soit par l'inhibition de ces enzymes lysosomales soit par la stabilisation des membranes lysosomales [3]. La capacité d'inhiber la dénaturation des protéines et la déstabilisation des membranes des érythrocytes par l'extrait *n*-BuOH indique qu'il est apte à moduler et contrôler l'amplification de la réaction inflammatoire. Le mécanisme médiateur sous-jacent précis reste n'est pas clair mais il pourrait être dû à la présence des métabolites bioactifs dans l'extrait *n*-BuOH qui s'opposent à la fuite des protéases au niveau de la zone inflammatoire.

L'œdème induit par la carragénine, un mucopolysaccharide, représente un modèle empirique très utilisé dans les investigations concernant les inflammations aiguës. Les niveaux d'inflammation ont été retenus entre la 1^{ère} et 24 heures après l'injection de la carragénine.

La carragénine induit un maximum d'œdème à partir de la 3^{ème} heure suivant son injection [5]. L'extrait *n*-BuOH a un effet anti-inflammatoire en s'opposant à l'augmentation du volume de l'œdème induit par la carragénine (1%). Cet œdème dépendrait de la participation des kinines et des leucocytes avec leurs facteurs pro-inflammatoires comprenant des prostaglandines [6].

Généralement l'inflammation induite par la carragénine a été décrite comme événement biphasique [7]. La carragénine induit au cours de la phase initiale (1-2 heure) la production de facteurs pro-inflammatoires tels que l'histamine et la sérotonine [1]. Durant la phase tardive (4-12 heures) ce processus inflammatoire est caractérisé par un développement de l'œdème qui est attribuée à une perméabilité vasculaire améliorée et à la libération des substances *prostaglandin-like*, et des protéases lysosomales [1]. Les résultats montrent que l'extrait *n*-BuOH possède un degré variable d'activité anti-inflammatoire lorsqu'il est testé à deux doses différentes. Le traitement des rats à la dose (200 mg/kg) conduit à une réduction significative de la taille de l'œdème par rapport à celle obtenue chez les témoins et similaire au diclofénac. Ceci peut aussi nous conduire à suggérer que notre extrait renferme probablement des substances qui semblent inhiber l'œdème d'une manière semblable à celle du médicament de référence. Cette inhibition modérée en phase précoce s'explique éventuellement par l'inhibition de la libération des premiers médiateurs pro-inflammatoires tels que l'histamine, la sérotonine et les kinines [8]. L'action à la deuxième phase pourrait être due à une inhibition de la cyclooxygénase (COX), cela signifie que l'extrait *n*-BuOH inhibe la synthèse des prostaglandines en inhibant les deux isoformes COX-1 et COX-2 [9]. Il a été rapporté que la pharmacopée concède à la plupart des composés phénoliques une activité anti-inflammatoire [10,11], ce qui nous laisse penser que l'activité anti-inflammatoire de notre extrait serait due à la quantité et la qualité des composés qu'il comprend. Parmi ces composés se trouvent les flavonoïdes et les polyphénols qui sont capables d'inhiber les oxydants libérés par les leucocytes et d'autres phagocytes dans la zone inflammatoire [12].

Les résultats obtenus dans cette exploration sont similaires à celles rapportées par d'autres chercheurs. L'étude menée par Ait El Cadi et ses collaborateurs [1] a montré que les extraits aqueux et éthanoliques de *Zygophyllum gaetulum* peuvent être utilisés de manière raisonnée dans le traitement de l'inflammation. Amezouar et ses collaborateurs [12] ont également signalé que les feuilles de *E. arborea* contiennent des composés bioactifs doués d'une forte activité antioxydante ainsi que des propriétés anti-inflammatoires intéressantes.

Généralement l'inflammation aiguë est caractérisée par une augmentation de l'activité de la xanthine oxydase et de la peroxydation lipidique. Ceci conduit à une augmentation de l'activité de la phospholipase A2 (PLA2) qui catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires en acide arachidonique, ce dernier est impliqué dans la synthèse des eicosanoïdes, des prostaglandines et des leucotriènes [13].

Dans certains processus physiopathologiques associés à l'inflammation, les ERO ont été proposées comme intermédiaire des lésions cellulaires via un ensemble de mécanismes indépendants, y compris l'initiation de la peroxydation lipidique dont le MDA est l'un des produits final majeur provoqué par les radicaux libres [14,15].

Les neutrophiles sont parmi les cellules inflammatoires qui interviennent au cours de l'inflammation induite par la carragénine [16], la phase retardée est associée à leur infiltration et leur activation dans le tissu. L'activation des neutrophiles permet d'une part une dégranulation et une libération des protéines cationiques, la lactoferrine et des enzymes hydrolytiques, et d'autre part une activation de la consommation d'oxygène (éclatement respiratoire, ou respiratory burst) qui implique le fonctionnement de la NADPH-oxydase, la MPO et la NO-synthétase (iNOS), agissant ensemble ils produisent des espèces oxydantes [17]. Le (NO) synthétisé par la iNOS est capable d'interagir avec l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) pour former le peroxydinitrite ($ONOO^-$), un puissant oxydant cytotoxique qui provoque une peroxydation lipidique et endommage les cellules [18]. Par ailleurs, l'activité de la MPO est considérée comme un marqueur sensible est spécifique de l'inflammation aiguë, car elle reflète l'infiltration des cellules polymorpho-nucléaires (PMNs) vers le parenchyme [19].

En effet, les taux élevés de la MPO peuvent contribuer à l'augmentation du stress oxydant et la production d'espèces radicalaires intermédiaires [20]. La MPO réagit avec les (NO_2^-) et ($ONOO^-$) directement ou via la production d'acide hypochloreux (HOCl), pour générer des ERO sous forme des dérivés chlorés [17].

Le prétraitement des rats par l'extrait *n*-BuOH confirme que cet extrait a un effet anti-inflammatoire en conservant les taux de MDA et la MPO d'une façon significative et comparable à celle du diclofénac. Les métabolites secondaires présents dans cet extrait contribuent probablement à cet effet en inhibant le recrutement des neutrophiles vers le parenchyme. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres travaux récents. À titre d'exemple, dans une étude menée sur l'extrait éthanolique des racines de *Pogostemon cablin*, Li et ses collaborateurs [21] ont

mis en évidence l'existante d'une corrélation entre l'activité anti-inflammatoire, la diminution des taux de MDA, la MPO et le (NO), et la teneur de l'extrait en composés phénoliques.

L'étude histologique a permis d'observer des changements pathologiques tels que une hyperplasie dermique et épidermique, une perte du tissu conjonctif, des vacuoles spongieux et une forte accumulation d'infiltrat des cellules inflammatoires dans le tissu des pattes; alors que l'administration orale de l'extrait *n*-BuOH a atténué significativement l'accumulation d'infiltrat ainsi que le nombre de PMNs ayant migré. Ces changements pathologiques ont été en corrélation avec les taux élevés de la MPO. Les résultats retenus dans ce travail sont comparables à ceux obtenus par de Bas et ses collaborateurs [22].

La péritonite induite par la carragénine est aussi un test qui permet d'évaluer l'activité anti-inflammatoire aiguë. L'injection de la carragénine a induit une augmentation du contenu péritonéal de prostaglandine, sérotonine et histamine [23]. Ceci conduit à une dilatation des artérioles et des veinules et une augmentation de la perméabilité vasculaire, et par conséquent, l'extravasation des protéines plasmatiques et des leucocytes vers la cavité péritonéale [24]. La pleurésie est due à la libération des médiateurs dérivés des neutrophiles comme le (NO) et la formation des radicaux libres [25]. Plusieurs études ont rapporté que le radical (NO), qui joue un rôle important dans divers processus inflammatoires, est apparemment impliqué dans les deux phases de l'inflammation induite par la carragénine et dans les deux modèles aussi : l'œdème de la patte [26] et la péritonite (1-6h) [27].

Le prétraitement des rats par l'extrait *n*-BuOH confirme que cet extrait a une activité anti-inflammatoire, car nous avons observé une réduction significativement de la perméabilité des leucocytes, des neutrophiles et du taux du (NO) dans le liquide péritonéal. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par le diclofénac. Selon la littérature le diclofénac agit sur l'inhibition des prostaglandines par la stimulation non sélective de COX-1 et COX-2 [9]. Le mode d'action de l'extrait *n*-BuOH semble être pareil.

L'analyse chimique préliminaire des parties aériennes de *L. tingitana* montre qu'elle présente une diversité de groupes chimiques tels les alcaloïdes et les stérols non saturés, les terpénoïdes, les flavonoïdes. La majorité des travaux effectués sur l'activité biologique de ces composés montrent qu'ils sont des anti-inflammatoires et antioxydants puissants [28]. Plusieurs études ont rapporté que les flavonoïdes inhibent la migration des leucocytes en bloquant leur adhésion à la paroi vasculaire [29,30]. Cet effet pourrait être dû à l'inhibition de la synthèse de l'IL-1 et le

TNF- α , principaux inducteurs de l'expression des facteurs d'adhésions sur la paroi vasculaire [31]. Takatoshi et ses collaborateurs [32] ont signalé que l'acide gallique neutralise la migration des leucocytes en inhibant les molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 (pour:Vascular cell adhesion protein), et E-selectin dans les cellules endothéliales vasculaires, et que ce blocage est dû à l'inhibition de l'IL-1, TNF- α , et le NF- κ B.

Le profil chimique obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) a confirmé une abondance des iridoïdes glycosés dans notre plante : ce groupe de composés ont également été identifiés dans d'autres plantes et révélé une activité anti-inflammatoire. Les études de phytosynergie sur les iridoïdes suggèrent qu'ils n'agissent pas d'une manière individuelle, mais ils peuvent exercer leur activité en agissant en synergie avec d'autres molécules [33]. Ceci pourrait expliquer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait *n*-BuOH. Cette conclusion est en accord avec les résultats obtenus par Rivière et ses collaborateurs [34] qui ont mis en évidence l'importance anti-inflammatoire des iridoïdes issues de *Scrophularia auriculata*.

Prenant ces données ensemble, on peut récapituler que l'extrait *n*-BuOH comprenne des composés exerçant un effet anti-inflammatoire via la réduction de la production des médiateurs inflammatoires impliqués dans le déroulement des étapes de la réaction inflammatoire aiguë induite par la carragénine tels que les leucotriènes, et les prostaglandines; et en exerçant des effets anti-chimio-attractants des leucocytes en inhibant l'expression et la fixation du NF- κ B, ce qui induit l'inhibition de leur recrutement vers le parenchyme et la cavité péritoniale.

Références bibliographiques

- [1] Ait El Cadi M, Makram S, Ansar M, et al. Anti-inflammatory activity of aqueous and ethanolic extracts of *Zygophyllum gaetulum*. *Ann Pharm Fr.* 2012; 70:113-116.
- [2] Umopathy E, Ndebia EJ, Meeme A, et al. An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. *J Med Plant Res.* 2010; 4:789-795.
- [3] Mahgoub AA. Grapefruit juice potentiates the anti-inflammatory effects of diclofenac on the carrageenan-induced rat's paw oedema. *Pharmacol Res.*2002; 45:1-4.
- [4] Chippada SC, Volluri SS, Bammidi SR, Vangalapati M. *In vitro* anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Centella asiatica* by HRBC membrane stabilisation. *Rasayan J Chem.* 2011; 4:457-460.
- [5] Elion Itou RDG, Sanogo R, Etou Ossibi AW, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of aqueous extract of stem bark of *Ceiba pentandra* Gaertn. *Pharmacol Pharm.* 2014; 5:1113-1118.
- [6] Damas J, Remacle-Volon G, Deflandre E. Further studies of the mechanism of counter irritation by turpentine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1986; 332:196-200.
- [7] Yeşilada E, Küpeli E. *Berberis crataegina* DC. root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79:237-248.
- [8] Perianayagam JB, Sharma SA, Pillai KK. Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extract in experimental animals, *J Ethnopharmacol.* 2006; 104:410-414.
- [9] León-Reyes MR, Castañeda-Hernández G, Ortiz MI. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of diclofenac in the presence and absence of glibenclamide in the Rat. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 2008; 11:68-76.
- [10] Ibrahim TA, Fagbonun ED. Phytochemical and mineral quality of dried seeds of *Buchholzia coriacea*. *J Appl Phytotechn Envi Sani.* 2013; 2:121-126.
- [11] Enechi OC, Nwodo OFC. Anti-ulcer and gastric, anti-secretory activities of seed extract of *Buchholzia coriacea* in wistar albinos rats. *Afr J Biotechnol.* 2014; 13: 2755-2761.
- [12] Amezouar F, Badri W, Hsaine M, et al. Évaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de *Erica arborea* L. du Maroc. *Pathol Biol.* 2013; 61: 254-258.

- [13] Rahman S, Ansari RA, Rehman H, et al. Nordihydroguaiaretic Acid from Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Mitigates 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Induced Inflammatory and Oxidative Stress Responses of Tumor Promotion Cascade in Mouse Skin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; ID 734785.
- [14] Deng JS, Chi CS, Huang SS, et al. Antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory activities of the ethanolic extracts of *Taxillus liquidambaricola*. *J Ethnopharmacol.* 2001; 137:1161-1171.
- [15] Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: Implications for microbial killing. *J Biol Chem.* 2006; 281:39860-39869.
- [16] Jilroy D, Colvillr-Nash PR, Willis D, et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med.* 1999; 5:698-701.
- [17] Serteyn D, Grulke S, Franck T, et al. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann Méd Vét.* 2003; 147:79-93.
- [18] Ianaro A, O'Donnell CA, Di Rosa M, Liew FY. A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice. *Immunology.* 1994; 82:370-375.
- [19] Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediat Inflamm.* 2008; ID135625:1-4.
- [20] Chaves L de S, Nicolau LA, Silva RO, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudate*. *Immunopharm Immunot.* 2013; 35:93-100.
- [21] Li CW, Wu XL, Zhao XN, et al. Anti-inflammatory property of the ethanol extract of the root and rhizome of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. *Scientific World Journal.* 2013; ID 434151:1-12.
- [21] Bas E, Recio MC, Abdallah M, et al. Inhibition of the pro-inflammatory mediators' production and anti-inflammatory effect of the iridoid scrovalentinoside. *J Ethnopharmacol.* 2007; 110:419-27.
- [23] Zhang CX, Dai ZR, Cai QX. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Sipunculus nudus* L. extract. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137:1177-1182.

- [24] Ramos JMO, Santos CA, Santana DG, et al. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. *Rev Bras Farmacogn*. 2013; 23:644-650.
- [25] Hajare SW, Chandra S, Sharma J, et al. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia sissoo* leaves. *Fitoterapia*. 2001; 72:131-139.
- [26] Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol*. 2004; 142:331-338.
- [27] Huang MH, Huang SS, Wang BS, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Cardiospermum halicacabum* and its reference compounds ex vivo and in vivo. *J Ethnopharmacol*. 2011; 133:743-750.
- [28] Cheriet T, Mancini I, Seghiri R, et al. Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae). *Nat Prod Res*. 2015; 29:1589-1513.
- [29] Manthey JM. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirc*. 2000; 7:28-34.
- [30] Middleton E JR, Kandaswami C, Heoradies TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*. 2000; 52:673-751.
- [31] Cho KJ, Yun CH, Yoon DY, et al. Effect of bioflavonoids extracts from the bark of *Pinus maritime* on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000; 168:64-71.
- [32] Murase T, Kume N, Hase T, et al. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19:1412-1420.
- [33] Viljoen A, Mncwangi N, Vermaak I. Anti-Inflammatory iridoids of botanical origin. *Curr Med Chem*. 2012; 19:2104-2127.
- [48] Rivière C, Goossens L, Guerardel Y, et al. Chemotaxonomic interest of iridoids isolated from a Malagasy species: *Perichlaena richardii*. *Biochem Syst Ecol*. 2011; 39:797-825.

Évaluation de l'activité antioxydante et hepatoprotective

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'hépatotoxicité de l'AVP mais le mécanisme exact reste une source de débat [1]. Selon la littérature l'incidence de l'atteinte hépatique liée à l'AVP est de l'ordre de 0,01% [2]. Plusieurs études ont rapporté que l'AVP interfère avec plusieurs processus métaboliques dans les mitochondries hépatiques telles que la β -oxydation et la phosphorylation oxydative [3]. Il est admis que l'AVP est presque uniquement métabolisé par le foie qui est l'organe cible dominant de la toxicité du valproate. Le sort métabolique de l'AVP est très complexe et conduit à la production de plus de 50 métabolites différents [4].

Les études cliniques et expérimentales avaient décrit que les atteintes hépatiques par l'AVP sont généralement caractérisées par une élévation fréquente des transaminases [5]. Les résultats de la présente étude ont clairement démontré une corrélation entre l'AVP (400 mg/kg) et l'activité des transaminases (ALT et AST) sériques chez les rats traités uniquement par ce médicament. L'augmentation significative de l'activité des transaminases sériques explique une atteinte hépatocytaire provoquant la libération de ces enzymes dans le compartiment extracellulaire [6].

Les rats traités par l'AVP ont développé des lésions hépatiques qui se manifestaient par une augmentation substantielle des concentrations plasmatiques de la LDH, l'ALP et de la bilirubine totale, ces résultats sont en adéquation avec ceux décrits par [7]. L'activité accrue de la LDH peut être attribuée à la dystrophie dans la perméabilité des membranes cellulaires [8]. L'augmentation de la concentration sérique de l'ALP traduit une atteinte cholestatique qui conduit à la libération de cette enzyme dans le compartiment plasmatique en présence d'une pression biliaire croissante. Il est probable que l'AVP affecte le parenchyme hépatique et induit une augmentation du taux de la bilirubine [9]. L'analyse histopathologique révèle des lésions nécrotiques ce qui confirme les altérations membranaires.

L'administration orale de l'extrait *n*-BuOH à (200 mg/kg) a atténué l'hépatotoxicité induite par l'AVP. Ces effets indiquent clairement que l'extrait *n*-BuOH peut donner une protection en stabilisant la membrane cellulaire vis-à-vis des lésions hépatiques induites par l'AVP d'une manière comparable à celle de la vitamine E.

La stéatose est une pathologie métabolique; elle se définit par une surcharge en lipides, c'est à dire la présence en excès de triglycérides qui sont normalement présents dans la cellule [10]. On parle de stéatohépatite lorsque le contingent lipidique représente plus de 5% de la masse

hépatique totale [11].

L'incidence des intoxications par l'AVP a augmenté en raison de ses plus larges prescriptions [12]. Les dysfonctions des mitochondries et/ou des lysosomes induites par ce médicament peuvent impliquer de nombreux métabolismes et des constituants mitochondriaux qui ont des conséquences diverses au niveau de l'hépatocyte telles le stress oxydant, le déficit énergétique, l'accumulation de triglycérides (stéatose) ou la mort cellulaire [13].

La déviation du métabolisme de l'AVP vers une ω -oxydation microsomale avec la formation de métabolites dicarboxyliques hépatotoxiques est à l'origine de sa toxicité. Cette déviation est rendue possible par une concentration intracellulaire élevée de l'AVP qui bloque la butyrobétaine-3-hydroxylase, enzyme responsable de la synthèse de L-carnitine, nécessaire au transport des AG à travers la membrane mitochondriale pour subir une β -oxydation [14].

La stéatose est le plus souvent consécutive à un apport excessif de graisses et/ou à un défaut de leur élimination par la β -oxydation mitochondriale [15]. De nombreux travaux ont montré que l'AVP interfère avec plusieurs voies métaboliques, et peut engendrer des dérivés qui inhibent les enzymes et les cofacteurs indispensables à l'oxydation des AG. L'inhibition de la β -oxydation aboutit à l'accumulation des AG dans le cytosol sous forme libre ou estérifiés en triglycérides émulsifiés provoquant une stéatose typiquement microvésiculaire [16].

Les résultats obtenus dans notre étude révèlent qu'une hyperlipidémie remarquable accompagnée d'une augmentation importante des triglycérides hépatiques ont été associées au traitement par l'AVP. L'augmentation des taux du cholestérol-LDL et des triglycérides peuvent contribuer à une stéatogénèse hépatique induite par l'AVP [17]. L'analyse en microscopie optique des atteintes histologiques au niveau du foie nous a permis de confirmer ces résultats et de révéler une stéatose microvésiculaire prédominante. Les changements histologiques et l'augmentation du profil lipidique peuvent être expliqués par les anomalies du métabolisme lipidique induites par l'AVP tel que la diminution de la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides et la perturbation de l'oxydation des AG [18]. Kesterson et ses collaborateurs [17] ont révélé que le 4-ene-AVP et ses métabolites de la β -oxydation, 2-propyl-2 et acide 4-pentadienoïque, peuvent produire une stéatose hépatique microvésiculaire sévère. En effet, il a été signalé que l'AVP induit des changements dans l'expression de 60 gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, ce qui est interconnecté avec les voies biologiques [19]. Ce profil d'expression des gènes peut être associé à l'hépatotoxicité stéatogénique issue de l'AVP [20].

Les rats co-traités avec l'extrait *n*-BuOH ont manifesté une modulation de la stéatose confirmée que ce soit par les coupes histologiques ou par la préservation des valeurs du lipidogramme. Cette modulation de la stéatose pourrait être due à la présence d'une large gamme de composés bioactifs notamment les flavonoïdes qui sont évidemment les plus impliqués dans cet effet. En outre, Bursill et Roach [21] ont montré que certains composés peuvent être impliqués dans le contrôle du lipidogramme tels les catéchines glyqués qui exercent une influence directe sur les niveaux de LDL et de HDL par une régulation de l'activité de liaison du récepteur LDL des cellules HepG2.

Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence un stress oxydant au cours d'une stéatose hépatique induite par l'AVP notamment une élévation de la peroxydation lipidiques et un déséquilibre dans le système de défense antioxydant enzymatique et non enzymatique [22]. Durant la pathogenèse, le stress oxydant représente un facteur déterminant dans le déclenchement de la stéatose hépatique [23]. Une concentration élevée (dose toxique) d'AVP peut affecter l'activité de CYP450, cette enzyme procède ainsi à leur gestion métabolique. Cette réaction est, cependant, associée à la génération de radicaux libres provoquant la peroxydation lipidique et les dommages hépatiques [24].

Les ERO produites par les mitochondries, capables d'épuiser l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants de la cellule, aboutissent à un déséquilibre du système redox cellulaire au profil des pro-oxydants. Elles favorisent également l'oxydation des AG insaturés des phospholipides membranaires dans les hépatocytes menant à une peroxydation des lipides qui engendre des dérivés aldéhydiques toxiques tels que le MD et le 4-HNE. Ces derniers sont aptes à déformer la structure des membranes et à provoquer en conséquence la perméabilité et la mort cellulaire [25]. Le taux élevé de MDA, signe d'une peroxydation lipidique sévère, chez les rats traités uniquement par l'AVP peut développer des lésions hépatiques. Les ERO sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques. Ainsi, le radical ($^{\circ}\text{OH}$) et l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\circ-}$) s'attaquent aux protéines des tissus de soutien, tels le collagène du tissu conjonctif. L'oxydation des acides aminés conduit à une modification de la conformation spatiale et à une altération de la fonction protéique. Les protéines oxydées perdent leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand, et altèrent la signalisation cellulaire [26]. Cette atteinte aboutit à une destruction de la membrane qui conduit à une augmentation de la perméabilité membranaire. Par conséquent, les

substances normalement contenues dans l'hépatocyte vont être larguées dans les sinusoides et leur concentration dans le sang périphérique va augmenter. Les activités des ALT et AST, de la LDH et de la ALP augmentées chez les rats traités par l'AVP permettent d'apprécier l'existence et l'intensité de la cytolysse. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Kaplowitz [27].

A partir de cas de surdosage entraînant une hépatotoxicité, des analyses microscopiques réalisées sur coupes de parenchyme ont permis de mettre en évidence des signes de nécrose hépatique. L'essentiel de cette nécrose localisée au centrolobulaire est authentifiée par une dégénérescence hépatocytaire. Par ailleurs, un infiltrat leucocytaire essentiellement à polynucléaires a été signalé. Les auteurs concluent à une nécrose fulminante hépatique touchant principalement les hépatocytes centrolobulaires [28].

L'augmentation de l'activité de la MPO, marqueur de l'infiltration des neutrophiles, est un indice qui reflète l'inflammation des tissus hépatiques altérés [29]. L'implication de l'activité de la MPO en tant qu'indice d'hépatotoxicité induite par les médicaments a été précédemment signalée [30]. Les neutrophiles également sont considérés comme source potentielle des ERO dans les sites inflammatoires [31]. Dans notre travail l'activité MPO hépatique élevée observée suite à l'administration d'AVP a suscité des réponses inflammatoires qui ont été confirmées par les examinations histopathologiques où l'infiltrat inflammatoire a été prouvé dans la région triade portale du foie traité par l'AVP.

L'extrait *n*-BuOH renferme des composés qui ont exercé un effet hépatoprotecteur anti-peroxydant contre l'effet délétère des radicaux libres; ceci pourrait être expliqué par les propriétés antioxydantes de ces composés qui ont assuré le maintien des taux de MDA à son niveau cytosolique normal et la préservation des cellules hépatique chez les rats traités par l'AVP et l'extrait [32].

Plusieurs études ont rapporté que le mécanisme toxique de l'AVP est associé à un stress oxydant et à une formation accrue d'ERO [33]. Les types des radicaux produits ainsi que leurs lieux de production et de propagation sont variés, ils peuvent être d'origine mitochondrial, péroxysomal ou microsomal [34].

Les antioxydants au sens large sont toutes substances susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les ERO [35]. Parmi les systèmes antioxydants enzymatiques cellulaires figurent en première ligne la SOD et la CAT. L'anion superoxyde

($O_2^{\circ-}$), première espèce toxique formée à partir de l'oxygène, est éliminé et maintenu à un niveau de concentration assez bas par la SOD qui catalyse sa desmutation en (H_2O_2). Ce dernier est transformé en (H_2O) et (O_2) par la CAT [36].

Les résultats obtenus montrent un déséquilibre dans le statut redox cytosolique hépatocytaire chez les rats recevant l'AVP en faveur des prooxydants mettant les cellules hépatique dans un état de stress oxydant. L'évaluation biochimique de l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants (la CAT et la SOD) a mis en évidence une réduction significative de l'activité cytosolique de ces enzymes dans le foie chez les rats recevant l'AVP seul. La réduction d'activité des enzymes est le résultat d'une production excessive ou incontrôlée des ERO qui sont potentiellement cytolytiques [37].

La cellule est dotée pour sa protection le GSH, porteur d'une fonction thiol qui constitue un système antioxydant de la première défense en se liant par sa fonction SH aux métabolites toxiques. Il joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydantes telles le GPx, la CAT et la SOD [38]. La régénération de la fonction thiol GSH à partir de la forme oxydée se fait grâce à l'activité du GR. Dans les conditions physiologiques normales, il est présent essentiellement sous sa forme réduite. La mesure du taux GSH/GSSG est une bonne méthode pour évaluer le stress oxydant dans l'organisme. Le GSH joue son rôle d'antioxydant en tant que un facteur limitant pour les GPx car il est utilisé comme un substrat [39]. En plus de ces rôles physiologiques existants, le GSH est aussi considéré comme un puissant antioxydant suite à son habilité à donner l'hydrogène ce qui lui permet de réduire les radicaux libres, et certaines espèces réactives telles que ($HOCl$) et ($ONOO^-$). Le GSH est aussi capable de chélater les ions cuivreux et ferreux et limiter ainsi leur participation à la réaction de Fenton, de ce fait il constitue la première ligne de défense contre la toxicité des métaux [40].

Conformément à ce qui est fréquemment décrit chez les patients ou chez les rats atteints d'une hépatotoxicité induite par l'AVP [41], nous avons constaté dans notre étude une chute importante des taux du GSH et des activités du système enzymatique de glutathion (GR, GPX et GST) chez les rats traités uniquement par l'AVP. La diminution de l'activité du GR favorise potentiellement le déséquilibre entre GSH/GSSG en faveur du glutathion oxydé, ce qui pourrait induire une déplétion en GSH [42]. La co-réduction de GSH et du GST favorise largement la formation des radicaux libres, la dégradation du système de défense antioxydant dépendant du GSH, et par voie de conséquence stimule un stress oxydant [43].

Les taux de GSH sont nettement diminués suite à leur action de neutralisation des radicaux libres générés par l'AVP, ce phénomène provoque également sa déplétion et facilite la peroxydation des lipides et l'oxydation des groupements thiols des protéines [44]. Cependant, le co-traitement des animaux par l'extrait *n*-BuOH à (200 mg/kg) a empêché la diminution du GSH et permis de corriger la réduction d'activité du système enzymatique dépendant du de glutathion observées chez les rats recevant le valproate en maintenant leur niveau cellulaire normal. En outre, les activités des enzymes du système de défense antioxydant (SOD, CAT) sont conservées sous l'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH. Les polyphénols présents dans l'extrait *n*-BuOH pourraient jouer un rôle protecteur en conservant l'équilibre de la balance antioxydant/prooxydant des cellules hépatiques.

Le co-traitement par l'extrait *n*-BuOH a préservé le taux de GSH et les autres enzymes du système glutathion, ceci reflète la capacité de notre extrait à éliminer les ERO produits par l'AVP dans le foie. Les résultats peuvent s'expliquer par la présence des composés bioactifs responsables du piégeage des ERO tel que les flavonoïdes. En effet, plusieurs rapports ont révélé l'effet des flavonoïdes sur le système de glutathion [45]. Il a été suggéré que les flavonoïdes peuvent stimuler la transcription des enzymes antioxydants [46]. Cela est confirmé par des études *in vitro* et *in vivo* qui indiquent que les flavonoïdes peuvent augmenter, en concomitance avec l'augmentation du GSH, l'expression de la glutamate-cystéine ligase, enzyme qui intervient dans la biosynthèse du glutathion, [47].

Les mécanismes antioxydants possibles de l'extrait *n*-BuOH comprend sa capacité à éliminer les ERO ou à améliorer les niveaux des enzymes antioxydants endogènes. Ces propriétés permettent à cet extrait d'agir en tant qu'agent réducteur, donneur d'hydrogène, éliminant ainsi les radicaux alcoylés et peroxyés lipidiques en augmentant l'activité d'une cascade d'enzymes antioxydantes modulant les enzymes clés associées à la maintenance du GSH. Cet effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH peut être expliqué par l'action antioxydante des substances naturelles actives y incluses. Parmi ces substances, les composés phénoliques et notamment les flavonoïdes qui occupent une place importante dans le traitement de nombreuses pathologies, entre autres les hépatopathies, la jaunisse, le système vasculaire [48,49]. Cela suggère que notre extrait possède la possibilité d'inhiber la génération des ERO soit par inhibition des enzymes responsables ou par piégeage de ces espèces; ceci a été confirmé lors des travaux *in vitro* mentionnés précédemment.

Dutot et ses collaborateurs [50] ont montré que les extraits riches en polyphénols ainsi ont prouvé des effets antioxydants au niveau des cellules ARPE-19 après l'induction d'un stress oxydant. Des études précédentes ont montré que ces composés peuvent réduire les effets toxiques de stress oxydant en améliorant l'activité des enzymes antioxydants par la modulation de leur expression. Il a été montré que différents flavonoïdes tels que la lutéoline, le resvératrol ou l'extrait de *Ginkgo biloba* stimulent l'activité SOD dans différentes situations inflammatoires au niveau du côlon [51].

Afin d'évaluer l'effet protecteur des molécules antirrhides (B9-4-6-1) et (B9-6-1B-6-4) isolées de l'extrait *n*-BuOH, la viabilité des cellules HepG2 traitées par l'AVP a été réalisée.

L'AVP à (10 mM) a diminué de la viabilité cellulaire; selon [11], ceci pourrait être due aux perturbations des membranes cellulaires induites par la génération des ERO. D'après cette étude les molécules antirrhides n'ont pas pu maintenir la viabilité des cellules HepG2 traitées avec l'AVP, bien que l'étude *in vivo* ait montré que l'extrait *n*-BuOH possède des propriétés antioxydantes hépatoprotectrices considérables. En tenant compte ces résultats on peut déduire que l'action de l'extrait *n*-BuOH pourrait être due à un effet de synergisme entre les molécules composant cette fraction.

Références bibliographiques

- [1] Meunier H, Carraz G, Meunier Y, et al. Propriétés pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacétique. *Thérapie*. 1963; 18:435-438.
- [2] Bédry R, Parrot F. Intoxication grave par l'acide valproïque. *Réanimation*. 2004; 13:324-333.
- [3] Silva MF, Aires CC, Luis PB, et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inher Metab Dis*. 2008; 31:205-216.
- [4] Silva MF, Ruitern JP, Overmars H, et al. Complete β -oxydation of valproate: cleavage of 3-oxovalproyl-CoA by a mitochondrial 3-oxoacyl-CoA thiolase. *Biochem J*. 2002; 262:755-760.
- [5] Ghozzi H, Hakim A, Sahnoun Z, et al. Relationship between plasma concentrations of valproic acid and hepatotoxicity in patients receiving high doses. *Rev Neurol (Paris)*. 2011; 167:600-606.
- [6] Dobbs NA, Twelves CJ, Gregory W, et al. Epirubicin in patients with liver dysfunction: development and evaluation of a novel dose modification scheme. *Eur J Cancer*. 2003; 39:580-586.
- [7] Miranda Herrero MC, Alcaraz Romero AJ, Escudero Vilaplana V, et al. Pharmacological interaction between valproic acid and carbapenem: what about levels in pediatrics? *Eur J Paediatr Neurol*. 2015;19:155-161.
- [8] Shtukmaster S, Ljubuncic P, Bomzon A. The effect of an aqueous extract of *Teucrium polium* on glutathione homeostasis in vitro: A possible mechanism of its hepatoprotectant action. *Adv Pharmacol Sci*. 2010; ID938324.
- [9] Madkour FF, Abdel-Daim MM. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Dunaliella Salina* in Paracetamol-induced acute toxicity in rats. *Indian J Pharm Sci*. 2013; 75:642-648.
- [10] Aktas A, Nergiz Y, Nergiz Y, et al. The effects of valproic acid on renal corpuscle of pregnant rats and protective role of folic acid and vitamin E. *Afr J Biotechnol*. 2010; 9:5605-5610.
- [11] Komulainen T, Lodge T, Hinttala R, et al. Sodium valproate induces mitochondrial respiration dysfunction in HepG2 in vitro cell model. *Toxicology*. 2015; 331:47-56.
- [12] Meunier H, Carraz G, Meunier Y, et al. Propriétés pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacétique. *Thérapie*. 1963; 18:435-438.
- [13] Neels HM, Sierens AC, Naelaerts K, et al. Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42:1228-1255.

- [14] Mégarbane B, Deye N, Baud F. Foie toxique : mécanismes lésionnels et thérapeutiques pharmacologiques spécifiques. *Réanimation*. 2007; 16:632-642.
- [15] Fromenty B. Toxicité mitochondriale et métabolique des médicaments : mécanismes et conséquences au niveau du foie. *Réanimation*. 2010; 19:552-567.
- [16] Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial β -oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther*. 1995; 67:101-154.
- [17] Kesterson JW, Granneman GR, Machinist JM. The hepatotoxicity of valproic acid and its metabolites in rats. I. Toxicologic, biochemical and histopathologic studies. *Hepatology*. 1984; 4:1143-1152.
- [18] Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Can Med Assoc J*. 2005; 172:899-905.
- [19] Lee MH, Hong I, Kim M, et al. Gene expression profiles of murine fatty liver induced by the administration of valproic acid. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007; 220:45-59.
- [20] Lee MH, Kim M, Lee BH, et al. Subchronic effects of valproic acid on gene expression profiles for lipid metabolism in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 226:271-284.
- [21] Bursill CA, Roach PD. Modulation of cholesterol metabolism by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate in cultured human liver (HepG2) cells. *J Agric Food Chem*. 2006; 54:1621-1626.
- [22] Kiang TK, Teng XW, Surendraddoss J, et al. Glutathione depletion by valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes: Role of biotransformation and temporal relationship with onset of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011; 252:318-24.
- [23] Abdelmalek MF, Angulo P, Jorgensen RA, et al. Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96:2711-2717.
- [24] Rettie AE, Sheffels PR, Korzekwa KR, et al. CYP4 isozyme specificity and the relationship between omega-hydroxylation and terminal desaturation of valproic acid. *Biochemistry*. 1995; 34:7889-7895.
- [25] Berson A, De Beco V, Lettéron P, et al. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology*. 1998; 114:764-774.
- [26] Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*. 1997; 324:1-18.

- [27] Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. *J Hepatol.* 2000; 32:39-47.
- [28] Zimmerman HJ, Ishak KG. Antiepileptic Drugs. In: Cameron RG, Feuer G, de la Iglesia FA, eds. Drug-induced hepatotoxicity. Berlin: Springer-Verlag, 1996; 637-662.
- [29] Cross AS, Sakarya S, Rifat S, et al. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J Biol Chem.* 2003; 278:4112-4120.
- [30] Faith M, Sukumaran A, Pulimood AB, Jacob M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? *Clin Chim Acta.* 2008; 396:23-25.
- [31] Tsuji K, Kubota Y, Yamamoto S, et al. Increased neutrophil chemotaxis in obstructive jaundice: an in vitro experiment in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999; 14:457-463.
- [32] Kebièche M, Lakroun Z, Mraïhi Z, Soulimani R. Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie.* 2011; 9:274-282.
- [33] Tong V, Teng XW, Chang TK, Abbott F. Valproic acid I: Time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats. *Toxicol Sci.* 2005; 86:427-435.
- [34] Hamed SA, Abdellah MM. Trace elements and electrolytes homeostasis and their relation to antioxidant enzyme activity in brain hyperexcitability of epileptic patients. *J Pharmacol Sci.* 2004; 96:349-359.
- [35] Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 1993; 215:213-219.
- [36] 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; 33:337-349.
- [37] Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999; 32:595-603.
- [38] Morin D, Thiery H, Spedding M, Tillement JP. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *J Physiol Pharmacol.* 2001; 13:22-67.
- [39] Kruidenier L, Verspaget HW. Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease-radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; 16:1997-2015.
- [40] Théron P, Bonnefont-Rousselot D. "Systèmes antioxydants endogènes. Radicaux libres et stress oxydant. Paris, Lavoisier: 2005; 87-111.

- [41] Pourahmad J, Eskandari MR, Kaghazi A, et al. A new approach on valproic acid induced hepatotoxicity: involvement of lysosomal membrane leakiness and cellular proteolysis. *Toxicol In Vitro*. 2012; 26:545-551.
- [42] Dost T, Ozkayran H, Gokalp F, et al. The effect of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) on experimental colitis in rat. *Dig Dis Sci*. 2009; 54:1214-1221.
- [43] Czczot H, Ścibior D, Skrzycki M, and M. Podsiad. 2006. Glutathione and GSH-dependent enzymes in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Acta Biochim. Pol.* 53: 237-242.
- [44] Vessal M, Hemmati M, Vasei M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2003; 135:357-364.
- [45] Durgo K, Vukovic L, Rusak G, et al. Effect of flavonoids in glutathione level, lipid peroxidation and cytochrome P450 CYP1A1 expression in human Laryngeal carcinoma cells. *Food Technol Biotechnol*. 2007; 45:69-79.
- [46] Myhrstad MC, Carlsen H, Nordström O, et al. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radical Biol Med*. 2002; 32:386-393.
- [47] Moskaug JØ, Carlsen H, Myhrstad MC, Blomhoff R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81:277-283.
- [48] Boumerfeg S, Baghiani A, Messaoudi D, et al. Antioxidant Properties and Xanthine Oxidase Inhibitory Effects of *Tamus communis* L. Root Extracts. *Phytother Res*. 2009; 23:283-288.
- [49] Baghiani A, Harrison R, Benboubetra M. Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase. *Arch Physiol Biochem*. 2003; 111:407-414.
- [50] Dutot M, Rambaux L, Warnet JM, Rat P. Modulation du stress oxydant par la myrtille riche en polyphénols sur un modèle de cellules humaines de rétine. *J Français d'Ophthalmologie*. 2008; 31: 975-980.
- [51] Yao J, Wang JY, Liu L, et al. Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Arch Med Res*. 2010; 41:288-294.

Évaluation du dysfonctionnement mitochondriale

Afin de mieux cerner les mécanismes liés à l'hépatotoxicité induite par l'AVP nous nous sommes intéressées au rôle du dysfonctionnement mitochondrial qu'il provoque et sa probable interaction avec l'extrait *n*-BuOH.

La documentation sur l'hépatotoxicité de l'AVP via le dysfonctionnement mitochondrial est riche, mais les mécanismes moléculaires impliqués sont mal connus. L'AVP interfère avec plusieurs voies métaboliques. Il provoque une stéatose microvésiculaire qui est due principalement à une inhibition sévère de l'oxydation mitochondriale des AG [1]. Les effets délétères de l'AVP peuvent être dus à la molécule mère ou à l'un de ses métabolites réactifs [2]. Ces effets nocifs peuvent diminuer de la synthèse d'ATP induite par l'altération de la phosphorylation oxydative qui peut aboutir à la sortie du Cyt *c*, activant alors le processus d'apoptose et la survenue d'une nécrose concomitante.

Afin d'évaluer ces hypothèses, nous avons utilisé des isolats mitochondriaux hépatiques. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les mitochondries isolés de foie de rats exposés à l'AVP présentent une altération de la phosphorylation oxydative par diminution de la vitesse (V_3), et du (RCR) lorsque les substrats (palmitoyl-carnitine/malate, glutamate/malate et pyruvate) sont utilisés. Cet effet est associé à une diminution de l'activité du complexe I. Ceci est en accord avec les travaux de Silva et ses collaborateurs [2].

Le malate devient de l'oxaloacétate via la malate dehydrogenase, libérant un NADH qui va s'oxyder en NAD^+ par le complexe I. Le palmitoyl-carnitine peut entrer dans la mitochondrie sans subir la régulation de la CPT I. Une fois dans la matrice le palmitoyl-carnitine peut entrer dans le cycle de β -oxydation et fournir ainsi du NADH (complexe I) et du FADH_2 à la chaîne respiratoire. L'acétyl-CoA issu de la β -oxydation peut alors entrer dans le cycle de Krebs et entraîner la formation de NADH. L'utilisation de palmitoyl-carnitine/malate comme substrats permet alors de mesurer la consommation d'oxygène liée à la β -oxydation mais sans prendre en compte la régulation exercée par la CPT I sur l'entrée des AG. Le pyruvate, une fois entré dans la mitochondrie, est transformé en acétyl-CoA par le pyruvate déshydrogénase (formation d'un NADH). L'acétyl-CoA peut alors entrer dans le cycle de Krebs et entraîner la formation de NADH. L'utilisation d'une forte concentration de malate induit l'inhibition de la succinate déshydrogénase et donc la formation de FADH_2 . L'utilisation de pyruvate/malate

comme substrats, permet alors de mesurer la consommation d'oxygène uniquement liée à l'entrée des électrons via le complexe I (NADH). La roténone inhibe le complexe I évitant ainsi le flux reverse d'électrons vers le complexe I et le succinate fourni des électrons au complexe II.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer les résultats observés. En plus de l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire, cet effet peut provenir d'une production réduite de NADH et éventuellement de FADH₂ dans la matrice mitochondriale [2]. On peut récapituler donc que l'AVP n'affecte pas la chaîne de transport en soi (après le complexe II) ou le système de phosphorylation oxydative, car la respiration n'est pas affectée par l'AVP lorsqu'on a utilisé la (succinate/roténone) comme substrat énergisant. Aucun effet inhibiteur remarquable d'AVP n'a été enregistré sur les autres complexes de la chaîne respiratoire, ce qui signifie que l'AVP n'affecte pas la synthèse de l'ATP. En effet, il a été prouvé que la cytotoxicité induite par l'AVP pouvait affecter l'oxydation du pyruvate en inhibant l'absorption du pyruvate dans les membranes mitochondriales [3]. Selon les données rapportées dans la littérature et les résultats obtenus, l'inhibition de la phosphorylation oxydative par l'AVP peut être attribuée à un effet inhibiteur direct et/ou à ses métabolites sur le complexe de pyruvate déshydrogénase, une inhibition compétitive sur le transporteur de pyruvate ou l'épuisement intramitochondrial de la CoA libre [4].

Par ailleurs, plusieurs études ont confirmé que l'AVP induit la diminution de la CoA, la carence en carnitine et des perturbations de la β -oxydation des AG [1]. Comme l'inhibition induite par l'AVP observés en présence de palmitoyl-carnitine et pyruvate, une approche utile, pour comprendre l'effet du mécanisme de l'AVP, propose que l'inhibition de la β -oxydation des AG soit l'effet principal qui soutient la théorie selon laquelle le valproate peut inhiber par séquestration de CoA comme valproyl-CoA qui finit par une diminution de la respiration. Ces résultats peuvent en effet expliquer, pourquoi une diminution des taux de consommation d'oxygène a été détectée, en particulier dans les mitochondries traitées par les substrats (palmitoyl-carnitine et pyruvate) car ces deriners partagent certains aspects communs de leur métabolisme avec la β -oxydation. Mais ceci suggère également que d'autres mécanismes via les ERO pouvaient être responsables de cette inhibition.

En outre, des études antérieures ont également rapporté que la surcharge des hépatocytes de rat avec de l'AVP pouvait augmenter l'inhibition de la respiration mitochondriale en raison de la formation d'ERO générés par la β -oxydation, ce qui contribue directement à l'inhibition de

la phosphorylation oxydative [5]. De nombreux travaux ont montré que l'AVP peut également induire une ouverture des PTPm qui entraîne à la réduction de la production d'énergie et à la mort cellulaire [6]. Les mécanismes précis par lesquels il induit l'ouverture des PTPm ne sont pas encore connus, mais il est possible que deux types d'évènements puissent jouer un rôle important :

-La production par la chaîne respiratoire, ou d'autres sources subcellulaires, d'ERO qui vont oxyder et altérer des protéines impliquées dans les PTPm;

-La production par l'intermédiaire de CYP450 d'un (ou de plusieurs) métabolite(s) réactif(s), capable(s) également d'altérer de façon irréversible les protéines du PTPm [7].

Ces réactions sont associées à la génération des radicaux libres qui peuvent causer la peroxydation lipidique et des dommages hépatiques, et en particulier mitochondriaux. Les dommages mitochondriaux vont à leur tour renforcer le stress oxydant [6].

Lors de l'évaluation du stress oxydant mitochondrial qui effectuée au niveau des mitochondries du foie des rats traités par l'AVP, un taux élevée de MDA a été enregistré qui reflète l'altération mitochondriale. Une telle hyper-peroxydation pourrait être le résultat d'une modification importante du statut redox mitochondrial en faveur des prooxydants et les dommages mitochondriaux pourraient à leur tour renforcer le stress oxydant [8]. En effet, la membrane mitochondriale, principale source intracellulaire d'ERO, est-elle même sensible à l'action de ces radicaux et la fonction mitochondriale peut être altérée par la peroxydation lipidique.

La mitochondrie est considérée comme une principale source de production d'ERO et on sait qu'une fuite d'électrons réduisant partiellement l'oxygène matriciel pour aboutir à la formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) [8] peut intervenir au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale au cours de la respiration. Selon des études réalisées sur des mitochondries isolées cette fuite des électrons provient de deux sites, dont l'un se situerait au niveau du complexe I et l'autre au niveau du complexe III [9]. Liu et ses collaborateurs [10] ont montré qu'il y a un transfert électronique inversé du complexe II vers le complexe I. Seifert et ses collaborateurs [11] ont montré que la β -oxydation des AG à chaînes longues est associée à une production accrue des ERO via un mécanisme incluant le complexe III. Le ($O_2^{\circ-}$) peut être transformé en (H_2O_2) par la Mn-SOD [12]. Le (H_2O_2) peut s'accumuler et entraîner un stress oxydant mitochondrial via la réaction de Fenton [13] qui donne naissance au radical ($^{\circ}OH$) qui est l'espèce radicalaire la plus délétère. Lorsque les systèmes antioxydants sont déplétés, à long terme, cette surproduction des ERO peut

surpasser les systèmes antioxydants mitochondriaux et surtout les protéines mitochondriales qui sont extrêmement sensibles aux dommages induits par les ERO provoquant un découplage de la chaîne respiratoire [13].

L'évaluation de la peroxydation lipidique produite dans les mitochondries hépatiques montre la génération d'un taux significativement élevé de MDA chez les rats traités par l'AVP. Par ailleurs une telle hyperperoxydation pourrait être le résultat d'une modification importante du statut redox mitochondrial en faveur des prooxydants.

Les résultats obtenus, montrent que les mitochondries isolés des rats traités par l'AVP souffrent d'un stress oxydant se manifestant également par une altération de taux des Mn-SOD, GSH et GPx mitochondriales, ce qui corrobore des résultats précédents indiquant que l'AVP réduit l'expression protéique de la Mn-SOD responsable de l'élimination de ce dernier [14]. De même la diminution des taux de Mn-SOD pourrait être due à sa nitration par les ERO générés par l'AVP. D'autre part une concentration plus élevée de l'AVP ou de ces métabolites conduit à l'épuisement du GSH [14,15]. L'hépatotoxicité de l'AVP est attribuée à ses métabolites détoxifiés par le GSH. Une concentration plus élevée de ces métabolites 4-ene VPA et (E)-2,4-diene conduit à l'épuisement du GSH. Suite à cette déplétion en GSH, les taux intracellulaires de peroxydes s'élèvent, provoquant un stress oxydant via une réaction de Fenton [16].

Il est intéressant de noter que l'extrait *n*-BuOH extrait de *L. tingitana* a réussi à protéger les membranes des mitochondries hépatiques d'une peroxydation lipidique et/ou de la transition de perméabilité à la membrane mitochondriale car les deux événements sont impliqués dans plusieurs processus pathologiques liés au stress oxydant. Des études précédentes rapportent que les flavonoïdes en général sont capables d'inhiber la peroxydation lipidique, comme ils sont susceptibles d'être oxydés, ils fonctionnent comme des groupes chélatants [17]. C'est ce qu'a révélé notre étude *in vitro*, et ceci pourrait expliquer l'activité anti-lipopéroxydante de notre extrait.

Nos résultats révèlent que l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* administrée oralement (200 mg/kg) au rats co-traité avec l'AVP protège les mitochondries en préservant le taux de Mn-SOD, GSH et GPx mitochondriales. Ceci peut être associée à l'effet antioxydant des composés bioactifs contenus dans notre extrait, des polyphénols et des flavonoïdes, qui sont caractérisés par leurs capacités à restaurer le dysfonctionnement mitochondrial en assurant une protection du statut redox intra-mitochondrial comme suggéré par Guzy et ses collaborateurs [18]. Ces

composés agissent différemment sur une ou plusieurs cibles, ils peuvent réduire le stress oxydant mitochondrial via la détoxification directe ou indirecte des ERO et/ou des métabolites toxiques néfastes pour les mitochondries [19].

La capacité antioxydante d'un flavonoïde dépend de sa structure chimique. Il existe plusieurs caractéristiques moléculaires qui confèrent la capacité à un flavonoïde donné de réduire les ERO [20]. Plusieurs flavonoïdes ont été démontrés inhiber différentes enzymes prooxydantes, telles que les lipoxygénases [21], la xanthine oxydase [22] et les NADH et NADPH oxydases [23].

Lors d'une évaluation du taux de libération de (H_2O_2) au niveau des mitochondries isolés du foie par le test de l'Amplex Red, une augmentation rapide initiale de la formation des ERO a été observée et il est intéressant de noter que cette augmentation est inhibée par l'extrait *n*-BuOH de *L. tingitana* ainsi que par les molécules antirrhine (B9-4-6-1 : 6-O-seneciolyantirrhinoside + 6-O-angeloylantirrhinoside et B9-6-1B-6-4 : antirrhine). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Swaroop et Ramasarma [22].

Bien qu'il ait été signalé que les flavonoïdes sont des inhibiteurs de l'activité de peroxydase, les flavonoïdes ont montré des effets différents sur le taux de production de (H_2O_2) par les mitochondries [20]. Cela peut indiquer que les propriétés de piégeage, précédemment démontrés, de notre extrait étaient responsables, au moins en partie, de ses effets protecteurs contre le dysfonctionnement mitochondrial induit par l'AVP.

Références bibliographiques

- [1] Silva MF, Aires CC, Luis PB, et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inherit Metab Dis.* 2008; 31:205-216.
- [2] Silva MF, Ruiten JP, Illst L, et al. Valproate inhibits the mitochondrial pyruvate-driven oxidative phosphorylation in vitro. *J Inherit Metab Dis.* 1997; 20:397-400.
- [3] Aires CC, Soveral G, Luís PB, et al. Pyruvate uptake is inhibited by valproic acid and metabolites in mitochondrial membranes. *FEBS Lett.* 2008; 582:3359-3366.
- [4] Haas R, Stumpf DA, Parks JK, Eguren L, Inhibitory effects of sodium valproate on oxidative phosphorylation. *Neurology.* 1981 ;31:1473-1476.
- [5] Luís PB, Ruiten JP, Aires CC, et al. Valproic acid metabolites inhibit dihydrolipoyl dehydrogenase activity leading to impaired 2-oxoglutarate-driven oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1767:1126-1133.
- [6] Labbe G, Pessayre D, Fromenty B. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008; 22:335-353.
- [7] Lee SJ, Jin Y, Yoon HY, et al. Ciclopirox protects mitochondria from hydrogen peroxide toxicity. *Br J Pharmacol.* 2005; 145:469-476.
- [8] Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol.* 2006; 91:807-819.
- [9] Fromenty B. Toxicité mitochondriale et métabolique des médicaments : mécanismes et conséquences au niveau du foie. *Réanimation.* 2010; 19:552-567
- [10] Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 2002; 80:780-787.
- [11] Seifert EL, Estey C, Xuan JY, Harper ME. Electron transport chain-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial H₂O₂ emission during long-chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem.* 2010; 285:5748-5758.
- [12] Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47:333-343.
- [13] Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry.* 2005; 70:200-214.

-
- [14] Komulainen T, Lodge T, Hinttala R, et al. Sodium valproate induces mitochondrial respiration dysfunction in HepG2 in vitro cell model. *Toxicology*. 2015; 331:47-56.
- [15] Zhang B, Wang X, Nazarali AJ. Ascorbic acid reverses valproic acid-induced inhibition of Hoxa2 and maintains glutathione homeostasis in mouse embryos in culture. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30:137-148.
- [16] van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20:331-342.
- [17] Guzy J, Chovanova Z, Marekova M, et al. Effect of quercetin on paracetamol-induced rat liver mitochondria dysfunction. *Biol Bratisl*. 2004; 59:399-403.
- [18] Zhao M, Wang P, Zhu Y, et al. The chemoprotection of a blueberry anthocyanin extract against the acrylamide-induced oxidative stress in mitochondria: unequivocal evidence in mice liver. *Food Funct*. 2015; 6:3006-3012.
- [19] Santos AC, Uyemura SA, Lopes JL, et al. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24:1455-1461.
- [20] Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, et al. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol*. 1991; 42:1673-1681.
- [21] Cos P, Ying L, Calomme M, et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod*. 1998; 61:71-76.
- [22] Steffen Y, Gruber C, Schewe T, Sies H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 469:209-219.
- [23] Swaroop A, Ramasarma T. Inhibition of H₂O₂ generation in rat liver mitochondria by radical quenchers and phenolic compounds. *Biochem J*. 1981; 194:657-665.

Évaluation du dysfonctionnement lysosomal

Il y a des indices croissants qui suggèrent que les lysosomes peuvent constamment communiquer avec d'autres structures cellulaires pour effectuer des programmes métaboliques spécifiques. Il a été montré que le dysfonctionnement mitochondrial perturbe aussi la structure et la fonction des lysosomes, organites capitaux de la dégradation et du recyclage. D'une manière spécifique, l'inhibition de la fonction mitochondriale suivant la suppression de la protéine mitochondriale AIF, ainsi que l'inhibition de la chaîne du transport d'électrons endommage l'activité lysosomale et provoque l'apparition de grandes vacuoles lysosomales [1].

Les lysosomes sont considérés à la fois comme source et également cible des ERO qui peuvent par conséquent activer une cascade protéolytique en provoquant la libération de tyrosine et la protéolyse générale [2].

Selon la littérature qu'on a consultée, l'effet du dysfonctionnement lysosomal par l'AVP reste insuffisamment investi par les chercheurs, ainsi les données biochimiques liées à l'hépatotoxicité induite par l'AVP *in vivo* demeurent fractionnées et confuses. Certains auteurs soutiennent l'hypothèse stipulant que le stress oxydant pourrait jouer un rôle clef dans le dysfonctionnement lysosomal [3]. Ceci nous a motivé à étudier les marqueurs biochimiques et le stress oxydant généré par l'AVP au niveau des lysosomes. Les résultats de notre étude montrent que l'AVP provoque un stress lysosomal se manifestant par une forte production de MDA et une diminution de la SOD.

Plusieurs études ont rapporté que le dysfonctionnement mitochondrial joue un rôle intermédiaire dans le dysfonctionnement lysosomal [4]. D'autres études récentes ont signalé que l'exposition des hépatocytes à l'AVP augmente la fragilité des membranes lysosomales, suite à la formation des ERO intracellulaires tel le (H_2O_2) par l'activation métabolique dont l'intermédiaire est le CYP450 ou la SOD [5]. Le (H_2O_2) peut facilement traverser la membrane lysosomale et réagir avec les ions $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^+$ lysosomiques engendrant le ($^{\circ}\text{OH}$) (réaction de Haber-Weiss) qui provoque un stress oxydant [6]. En conséquence, la réaction intralysosomale de Haber-Weiss menant à la formation de ($^{\circ}\text{OH}$) peut déstabiliser l'intégrité de la membrane lysosomale. Ces événements pourraient finalement donner lieu à une lyse des lipides et à une protéolyse des hépatocytes, un processus qui se termine par la mort cellulaire [2]. Ce constat est susceptible d'expliquer la fuite des enzymes lysosomales et leur passage dans le cytosol. Ainsi, nos résultats

expliquent d'une manière claire que l'altération des lysosomes qui est dépendante des ERO a induit la déstabilisation de la membrane lysosomale et a provoqué le relargage de contenu acide lysosomal ainsi que leurs enzymes tels l'ACP, la β -NAG, la Cathepsine-D et β -GLU chez les rats recevant l'AVP.

Les lysosomes contiennent une importante concentration de fer redox-actif, qui est principalement issue de la dégradation du fer contenu dans les protéines. Le pH faible et le milieu réducteur de ce compartiment facilitent les réactions oxydatives catalysant le fer [7]. A côté de la fuite des enzymes lysosomales au cytosol, l'altération partielle de ce compartiment vacuolaire acide permet aussi au fer actif libre, détaché du système redox, de se transférer au cytosol et au noyau [6]. En effet, il y a des indices soutiennent que la première interaction entre le (H_2O_2) et les métaux de transition (principalement le fer) aboutissant aux réactions de type Fenton, se produit dans les compartiments endosomaux/lysosomaux acides et aboutit indirectement aux dommages de l'ADN nucléaire [7].

Le stress oxydant peut aussi toucher la perméabilité de la membrane lysosomale en induisant l'altération des protéines de la membrane lysosomale via des liaisons disulphides [10]. Cette agrégation partielle des protéines de la membrane lysosomale peut aboutir à l'augmentation de la perméabilité des protons lysosomaux, du pH luminal et du potentiel membranaire. Donc, la perméabilité des membranes lysosomales pourrait dépendre de de l'état redox des groupements thiols membranaires [9,10]. La dégradation autophagique croissante des protéines dans ces conditions augmente aussi le pool de fer ferrique ainsi que la susceptibilité des cellules au stress oxydant [11].

Les oxydants exogènes ou les taux croissants des ERO mitochondriaux activent d'une manière directe et spécifique les canaux TRPML1 lysosomaux induisant la libération du cathepsine lysosomal. La sensibilité TRPML1 aux ERO est spécifiquement nécessaire pour l'adaptation des lysosomes aux atteintes mitochondriales [12]. La défaillance de la respiration mitochondriale détériore la fonction du lysosome, promeut l'accumulation de la sphingomyelin, et perturbe les voies du mouvement endolysosomal et de l'autophagie, liant ainsi le dysfonctionnement mitochondrial primaire au désordre du stockage lysosomal [13].

L'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) administré aux rats par voie orale a protégé les lysosomes contre un stress oxydant induit par l'AVP en diminuant le taux de MDA et en conservant le taux de la SOD. Ceci est probablement dû aux composés bioactifs présents dans cet extrait

mentionnés précédemment dans le screening phytochimique, principalement les polyphénols et les flavonoïdes. Ces molécules connues par leurs effets antioxydants pourraient chélater les ions (Fe^+) et bloquer la réaction Haber-Weiss et par conséquent neutraliser le stress oxydant lysosomal ainsi que l'interaction toxique lysosome/mitochondrie à l'intérieur des hépatocytes.

De façon surprenante nous avons observé que l'extrait *n*-BuOH a protégé la fuite des enzymes lysosomales d'une façon plus prononcée que la vitamine E administrée aux et rats co-traités par l'VPA. Il a été rapporté que la fuite persistante des enzymes lysosomales a le potentiel d'altérer sévèrement l'environnement de signalisation cellulaire et la rupture complète des membranes lysosomales, pourrait induire l'apoptose ou la nécrose; qui peut jouer un rôle de contrôleur du processus inflammatoires dans un microenvironnement tissulaire. La perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP) suivie par la libération des cathepsines, intermédiaires de la production des TFN- γ et TNF- α , initie la signalisation apoptotique, souvent via la voie apoptotique intrinsèque [12,14,15].

Comme l'extrait *n*-BuOH a diminué la libération d'enzymes lysosomales, médiateurs importants des pathologies inflammatoires, nous pouvons faire l'hypothèse qu'une des voies d'actions protectrice contre l'AVP concerne les capacités anti-inflammatoires de cet extrait. Cette propriété pourrait être justifiée par la présence des iridoïdes et des polyphénols. Ces résultats concordent avec Punithavathi et ses collaborateurs [16] qui ont mentionné que la rutine et la quercétine ont maintenu l'intégrité membranaire et ont contrecarré la fuite des enzymes lysosomales du tissu cardiaque à savoir l'ACP), la β -GAL, la β -NAG et la β -GLU.

Références bibliographiques

- [1] Boya P, Andreau K, Poncet D, et al. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med*. 2003; 197:1323-1334.
- [2] Pourahmad J, Hosseini MJ, Eskandari MR, et al. Mitochondrial/lysosomal toxic cross-talk plays a key role in cisplatin nephrotoxicity. *Xenobiotica*. 2010; 40:763-771.
- [3] Chang TK, Abbott FS. Oxidative stress as a mechanism of valproic acid associated hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*. 2006; 38:627-639.
- [4] Tong V, Teng XW, Chang TKH, Abbott FS. Valproic acid II: effects on oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and cytotoxicity in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicol Sci*. 2005; 86:436-443
- [5] Pourahmad J, Eskandari MR, Kaghazi A, et al. A new approach on valproic acid induced hepatotoxicity: involvement of lysosomal membrane leakiness and cellular proteolysis. *Toxicol In Vitro*. 2012; 26:545-551.
- [6] Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem Cell Biol*. 2008; 129: 389-406.
- [7] Starke PE, Gilbertson JD, Farber JL. Lysosomal origin of the ferric iron required for cell killing by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985; 133:371-379.
- [8] Pourahmad J, Mortada Y, Eskandari MR, Shahraki J. Involvement of Lysosomal Labilisation and Lysosomal/mitochondrial Cross-Talk in Diclofenac Induced Hepatotoxicity. *Iran J Pharm Res*. 2011; 10:877-887.
- [9] Zdolsek J, Zhang H, Roberg K, Brunk U. H₂O₂-mediated damage to lysosomal membranes of J-774 cells. *Free Radic Res Commun*. 1993; 18:71-85.
- [10] Lin Y, Epstein DL, Liton PB. Intralysosomal iron induces lysosomal membrane permeabilization and cathepsin D-mediated cell death in trabecular meshwork cells exposed to oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51:6483-6495.
- [11] Kurz T, Leake A, von Zglinicki T, Brunk UT. Lysosomal redox-active iron is important for oxidative stress-induced DNA damage. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1019:285-288.
- [12] Roberg K, Johansson U, Ollinger K. Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27:1228-1237.

- [13] Brunk UT1, Neuzil J, Eaton JW. Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep.* 2001; 6:91-97.
- [14] Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, et al. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest.* 2000; 106:1127-1137.
- [15] Bröker LE, Huisman C, Span SW, et al. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64:27-30.
- [16] Punithavathi VR, Prince PS. Pretreatment with a combination of quercetin and alphatocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. *Life Sci.* 2010; 86:178-184.

Conclusion et perspectives

Cette étude se place dans une problématique de recherche multidisciplinaire associant des techniques caractéristiques de la chimie et de la biologie.

Les résultats obtenus répondent aux différentes hypothèses de travail soulevées dans la l'introduction et ont permis de formuler une conclusion stipulant que la plante *L. tingitana* agit via une multitude de mécanismes impliquées dans la modulation du dysfonctionnement mitochondrial/lysosomal induit par l'AVP.

Dans le présent travail, le screening phytochimique montre la richesse de la cette plante en polyphénols avec un taux important des flavonoïdes et une présence importante des irridoloïdes. Les composés phénoliques renfermés dans cette plantes sont dotés d'un pouvoir antioxydant important, révélée par plusieurs teste *in vitro* qui reflètent les différents mécanismes probables impliqués dans cette activités.

Les résultats obtenus dans la première partie montrent une importante activité anti- inflammatoire de la plante *L. tingitana*, élucidées via plusieurs tests (dénaturation d'albumine, HRBC, effet scavenger du NO, l'œdème et la péritonite induits par la carragénine, MPO, l'infiltration des PN).

la deuxième partie nous a permis de juger que l'extrait *n*-BuOH à (200 mg/kg) a préservé la fonction hépatique en limitant la libération des transaminases, des LDH, des ALP et de la bilirubine, en modulant la stéatose et en neutralisant le stress oxydant induit par le l'AVP (400 mg/Kg). Cet effet est exprimé par la normalisation des paramètres antioxydants tels (SOD, CAT, système glutathion) et une modulation de la nécrose hépatocytaire à un degré comparable à celui de la vitamine E. Les molécules antirrhides isolées de cette plante ne sont pas arrivées à réduire l'effet toxique de l'AVP au niveau des lignées HepG2.

Le dysfonctionnement mitochondrial est exprimé par la diminution du taux de consommation d'oxygène au stade 3 dans les isolats mitochondriaux exposés à l'AVP, cet effet est plus prononcé au niveau du complexe I. L'extrait *n*-BuOH ainsi que les molécules isolées ont réussi de réduire l' H_2O_2 mitochondrial. L'importance de l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) consiste énormément dans sa capacité à réduire le stress oxydant mitochondrial induit par l'AVP.

Le dysfonctionnement lysosomal induit par l'VPA (400 mg/kg) est exprimé par une déstabilisation de la membrane lysosomale, une neutralisation importante du stress oxydant lysosomal et une préservation de l'intégrité membranaire est plus prononcée par l'extrait *n*-BuOH par rapport à la vitamine E. l'effet des molécules antirrhides sur la stabilité des membranes lysosomale des cellules HepG2 est moins efficace.

L'extrait *n*-BuOH possédant des propriétés antioxydants, anti-inflammatoire a pu préserver la fonction hépatique, moduler la stéatose et la stabilisé de la membrane lysosomale, réduire le stress oxydant hépatique mitochondrial et lysosomal induit par l'AVP. Ces multi-mécanismes ont pu retarder l'apparition des complications liées au dysfonctionnement mitochondrial/lysosomal, tel la nécrose. Ceci probablement est dû à la richesse diversifiée de cette plante en termes de substances bioactives qui lui attribuent divers mécanismes agissant en synergisme.

Cette contribution nous a permis d'ouvrir plusieurs perspectives dont les plus importants se résument dans ce qui suit :

- La poursuite de nos investigations à l'échelle moléculaire
- Clarifier l'effet anti-inflammatoire de cette plante en ciblant l'interaction des molécules isolée avec les voies de signalisation de l'inflammation et la mort cellulaire.
- Ce travail laisse aussi entrevoir d'autres perspectives plus lointaines qui pourraient servir de modèle pour la conception de nouveaux agents pharmacologiques

Résumé

Cette investigation s'intéresse à étudier l'effet modulateur de *Linaria tingitana* chez les rats traités par l'acide valproïque (AVP). Les études *in vitro* (DPPH°, Chélation, FRAP, β - carotène, NO°) ont montré que *Linaria tingitana* est dotées d'une propriété antioxydante. Les études anti-inflammatoires (dénaturation d'albumine, HRBC, effet scavenger du NO, l'œdème et la péritonite induites par la caragénine, élévation de la MPO, l'infiltration des PN) ont confirmé que *Linaria tingitana* a un effet bénéfique dans ce sens. Les études *in vivo* effectuée sur des rats traitées par l'AVP ont révélé que l'extrait *n*-BuOH agit par une multitude de mechnismes : préservation de la fonction hépatique, modulation de la stéatose, neutralisation du stress oxydant et réduction de l'inflammation hépatocytaire traduite par la diminution de l'activité MPO. Les molécules antirrhides isolées de cette plante étaient inefficaces au niveau de la lignée cellulaire HepG2 traitées par l'AVP. Le dysfonctionnement mitochondrial induit par l'AVP est exprimé par la diminution du RCR accompagné par une diminution de l'activité du complexe I. L'extrait *n*-BuOH ainsi que les molécules isolées ont réussi à réduire l'H₂O₂ mitochondrial et à moduler les systèmes antioxydants mitochondriaux et lysosomals. La préservation de l'intégrité membranaire lysosomale est plus prononcée par l'extrait *n*-BuOH par rapport à la vitamine E. L'ensemble des voies modulatrices de *L. tingitana* a retardé l'apparition des complications liées au dysfonctionnement mitochondrial, lysosomal, tel la nécrose. Probablement ceci est dû à la richesse diversifiée de cette plante en terme de polyphénols et en irridoïdes révélés par les screening phytochimique et l'analyse par LC-MS et à l'effet synergétique des molécules qu'elle renferme.

Mots Clés : Acide valproïque, *Linaria tingitana*, LC-MS. Dysfonctionnement mitochondrial, Dysfonctionnement lysosomal, Rats, HepG2, Inflammation, Stress oxydant.

Abstract

This investigation is interested to study the modulator effect of *Linaria tingitana* in rats treated by the valproic acid (VPA). The *in vitro* studies (DPPH°, FRAP, β -carotene, Chelation, NO°) showed that *Linaria tingitana* is endowed with an antioxidant property. The anti-inflammatory studies (albumin denaturation, HRBC, NO scavenger, oedema and peritonitis led by the carrageenan, the rise of MPO and the infiltration of the PN) confirmed that *Linaria tingitana* has a beneficial effect in this sense. The *in vivo* studies made to rats handled by the VPA revealed that the *n*-BuOH extract acts by a multitude of mechanisms: conservation of the hepatic function, the modulation of the steatoses, the neutralization of the oxidative stress and the reduction of the inflammation hepatocyte elucidated by the decrease of the activity MPO. Antirrhides molecules isolated of this plant were ineffective at the level of the cell line HepG2 treated with the VPA. The mitochondrial dysfunction led by the VPA is expressed by the decrease of the RCR accompanied by a decrease of the activity of the complex I. The *n*-BuOH extract as well as the isolated molecules managed to reduce the mitochondrial H₂O₂ and to modulate the antioxidant mitochondrial and lysosomal systems. The conservation of the integrity lysosomal membrane was more pronounced by the *n*-BuOH extract compared to the vitamin E. The various modulator ways of *L. tingitana* delayed the appearance of the complications linked to the mitochondrial dysfunction, lysosomal, such necrosis. Probably this is due to the diversified wealth of this plant in term of polyphenols and irridoids revealed by phytochemical screening and the analysis of the LC-MS and in the synergetic effect of the molecules that it contains.

Key words : Valproic acid, *Linaria tingitana*, LC-MS. Mitochondrial dysfunction, Lysosomal dysfunction, Rats, HepG2, Inflammation, Oxidative stress.