

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

N° d'ordre :152/Ds/2018

N° de série :05/BA/2018



Thèse de Doctorat Science

Option : biologie moléculaire et physiologie animale

Présentée et soutenu par :

DEFFA Ouafa

Intitulé :

---

Les interactions fonctionnelles des flavonoïdes de l'extrait  
butanolique de la plante *Heliotropium undulatum* vis-à-vis des  
mécanismes de l'hépatotoxicité de l'hydrazine chez le rat

---

Devant le jury :

Président :	Pr. KHELIFI-TOUHAMI Fatima.	Université des Frères Mentouri Constantine1
Directrice :	Pr. AMMEDAH Souad	Université des Frères Mentouri Constantine1
Co-Directeur :	Pr. MEKKIOU Ratiba	Université des Frères Mentouri Constantine1
Examineurs :	Pr. HAMBABA Leila	Université Ben Boulaid Batna 2
	Pr. BOURICHE Hamama	Université Abbas Ferhat Sétif 1
	Pr. DAHAMNA Saliha	Université Abbas Ferhat Sétif 1

Année 2017/2018

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

# Dédicace

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, je dédie ce modeste travail :

À mes très chers parents, sans eux je ne suis pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études et mes recherches. Chaque ligne de cette thèse chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être mes parents.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À mon très cher mari Badis, en signe d'amour et de gratitude pour m'avoir supporté, soutenu et surtout compris en permanence, pour ces sacrifices, ces encouragements, sa fidélité. Sans lui, je ne saurais pu progresser et en arriver à l'achèvement de ce travail.

À mes très chères et adorables petites filles, Rita, Assil, Nourcine qui m'ont porté le bonheur et la joie.

À mes chers frères et sœurs, Seyf el islam, Chams eddine, Nor elhouda, Dhia el hak, taki eddine.

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

À ma belle-mère ; Que dieu vous accorde santé et longue vie.

À la mémoire de mon beau Père ;

À la mémoire de mes Grands parents ;

J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.

# *Remerciements*

Je remercie tout d'abord **ALLAH** tout puissant de m'avoir donné la patience, la santé et la volonté pour réaliser cette thèse.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement ma directrice de thèse, Professeur **Souad AMEDDAH** pour avoir accepté de diriger et de suivre ce travail avec disponibilité, patience et bienveillance. M<sup>me</sup> vous méritez ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Professeur **Ratiba Mekkiou** co - encadreur de cette thèse pour sa compétence, sa rigueur scientifique, et pour le temps qu'elle a consacré à ma recherche.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury:

M<sup>me</sup> **KHELIFI-TOUHAMI Fatima** Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine1 d'avoir bien voulu accepter de présider ce jury en dépit de ses nombreuses occupations.

M<sup>me</sup> **HAMBABA Leïla**, Professeur à l'Université de BATNA 2, M<sup>me</sup> **BOURICHE Hamama**, Professeur à l'Université d'Abbas Ferhat Sétif 1, et Professeur **DAHAMNA Saliha** de l'Université d'Abbas Ferhat Sétif 1, pour l'intérêt qu'elles ont porté à ce travail et pour le grand honneur qu'ils me font en acceptant de le juger.

Je tiens à remercier Professeur **Ahmed MENAD** pour ses précieux conseils et son aide, vraiment vous êtes le moteur de mon travail de recherche.

Je présente mes remerciements à Dr **HACHANI Khadraoui**, Médecin spécialiste en anapathologie au CHU de Batna, par sa contribution pour la lecture des lames.

Je voudrais aussi remercier toutes personnes ayant contribué à la réalisation de cette thèse, en particulier **Badis DAIKH**, **Deffa dhia Eddine**, **Aissaoui Hanene**.

## Liste des abréviations utilisées

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
AG	Acides gras
ALAT	Alanine amino transférase
ALP	Alcaloïdes phosphatase
ANT	Adenosine Nucleotide Translocase
APs	alcaloïdes pirrolizidiniques
ASAT	Aspartate amino transférase
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BEUHL	extrait butanolique des feuilles de Heliotropium undulatum
BEUHS	extrait butanolique des tiges de Heliotropium undulatum
BuOH	butanol
Cyt	Cytochrome
CAT	Catalase
CCL4	Carbon tetrachloride
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
Clin	Clairance intrinsèque
COX-2	Cyclooxygenase-2
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1
CYP450	Cytochrome P450
DPPH	2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle
DTNB	Acide 5,5' -dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EDTA	Ethylene diamine tetra -acetic acide

Extrait n-BuOH	Extrait de n-butanol
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADH	Flavine Adénosine Dinucléotide, forme réduite
FADH	Flavine adénine dinucléotide
FADH2	Flavine adénine dinucléotide réduit
FMN	Flavine mononucléotide
FTIR Fourier	Transform Infra Red spectroscopy
GC/MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion disulfureoxydé
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
HD	Hydrazine
I %	Pourcentage d'inhibition
IC50 %	Concentration inhibitrice de 50 %
ICAM-1	Inter Cellular Adhesion Molecule
IL	Interleukine
INH	L'isoniazide
IP	Intrapéritonéal
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LC-MS	Analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
MDA	Malonyldialdéhyde
MG	Mégamitochondrie
Mn-SOD	Superoxy de dismutase mitochondrial
MPO	Myéloperoxydase
PTPm	Mitochondrial permeability transition pore

NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotideoxydé
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
ND	Non déterminé
NO	Oxyde nitrique (monoxide d'azote)
NOS	NO synthase
O <sup>-2</sup>	Radical anionsuperoxyde
O <sup>2°</sup>	Anion superoxyde
ppm	Parties par million
OH°	Radical anion hydroxyde
ONOO-	Peroxynitrite
OXPHOS	Oxidative phosphorylation OXPHOS
PTP	Pore de Transition de Perméabilité
RE	Réticulum endoplasmique
ROO°	Radical peroxy
ROS	Reactive Oxygen Species
ROS	Reactive oxygen species
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Thiobarbituric acid
TBARS	Thiobarbituric acid-reactive substances
TCA	Acide trichloroacétique
TGF-	Transforming growth factor bêta
THP 1	Cell Line human Leukemic monocyte
TNF-	Tumor necrosis factor

TOFMS	Time-of-flight mass spectrometry
T <sub>R</sub>	Temps de retention
UQ	Ubiquinone
VCAM	Vascular cell adhesion protein
VDAC	Voltage-dependent anion channels
VDAC	Voltage-dependent anion channel
Vit E	Vitamine E

## Liste des figures

Figure 1.1 : Molécule d'hydrazine $N_2H_4$ .....	7
Figure 1.2: Seuils de toxicité aiguë de l'hydrazine par inhalation pour un temps d'exposition de 1, 10, 20, 30 et 60 minutes (facteur de conversion 1 ppm = 1,31 mg.m <sup>-3</sup> ). .....	9
Figure 2.1 : Représentation schématique de la structure mitochondriale.....	16
Figure 2.2 : Inhibition du complexe II par l'hydrazine . .....	20
Figure 2.3 : Localisation membranaire de cytochromes P450 dans le réticulum endoplasmique .....	21
Figure 2.4 : Dérivés de l'hydrazine et réactives intermédiaires .....	22
Figure 2.5: Structure de l'hydralazine et la formation de divers métabolites réactifs catalysés par les ions métalliques ou par les enzymes . .....	23
Figure 2.6 : L'activation métabolique d'isoniazid (R=H) et d'iproniazid (R=CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) en diverses espèces réactives .....	23
Figure 2.7 : L'activation métabolique de procarbazine en métabolites intermédiaires réactifs . .....	24
Figure 3.1 : Répartition géographique des Boraginaceae dans le monde .....	35
Figure 3.2 : Structure de base des alcaloïdes pyrrolizidiniques .....	36
Figure 3.3 : structure de l'unité isoprène . .....	38
Figure 3.4 : Structures de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone .....	39
Figure 4.1 : Photo de <i>Helitopium undulatum</i> Vahl. ....	47
Figure 4.2 : Organigramme résumant les différentes étapes de macération et d'extraction des feuilles et des tiges de l'espèce <i>H. undulatum</i> .....	49
Figure 4.3 : la carte phénolique à deux dimensions réalisée par le papier Wattman N° 3 .....	53
Figure 5.1 : Carte phénolique des extraits BEUHL et BEUHS .....	71
<a href="#">z</a> Figure 5.2 : Chromatogramme RP-HPLC des extraits BEUHL et BEUHS .....	73
Figure 5.3 : structure des acides phénoliques et des flavonoïdes identifiés dans les extraits...74	
Figure 5.4 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH . .....	75

Figure 5.5: L'activité antioxydante des extraits BEHUL et BEHUS et la quercetin vis-à-vis le radical DPPH.....	76
Figure 5.6 : Effet de piégeage de radical hydroxyl des deux extraits BEHUL et BEHUS et la quercetin.....	77
Figure 5.7 : Effet chélateur des deux extraits BEHUS et BEHUL et de la quercitine.....	78
Figure 5.8 : Pouvoir réducteur des extraits BEHUS et BEHUL et la quercetine.....	79
Figure 5.9 : L'effet protecteur des deux extraits BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et de la vitamine E sur le niveau sérique des enzymes ALT et AST dans le foie des rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg). ....	81
Figure 5.10 : L'effet protecteur de BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et de la vitamine E sur le niveau sérique des enzymes ALP et bilirubine totale dans le foie des rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg). ....	82
Figure 5.11 : L'effet protecteur des deuxextraits BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et de la vitamine E sur le taux de MDA chez les rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg). ....	83
Figure 5.12 : L'effet protecteur des extraits BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et de la vitamine E sur le niveau sérique des enzymes de SOD et CAT dans le foie des rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg). ....	84
Figure 5.13 : L'effet protecteur des extraits BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et de la vitamine E sur le système glutathion cytosolique dans le foie chez des rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg).....	85
Figure 5.14 : L'effet protecteur des BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et de la vitamine E sur le système glutathion cytosolique dans le foie chez des rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg). ....	86
Figure 5.15 : L'effet des deux extraits BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et la vitamine E sur la variation des taux des enzymes antioxydants mitochondriale et de MDA des hépatocytes chez les rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg). ....	90
Figure 5.16 : Effet des deux extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) et la vitamine E sur l'oxydation du PNP chez des rats traités par HD (300mg/kg). ....	92
Figure 5.17 :L'effet scavanger des deux extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) et la quercetine contre le radical (NO°).....	101
Figure 5.18 : Effet des deux extraits BEHUS et BEHUL et le diclofenac l'inhibition de la dénaturation des protéines.Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=3). ....	103

Figure 5.19 : Effet des deux extraits BEHUS et BEHUL et le diclofenac sur la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC).....	104
Figure 5.20 : Effet des deux extraits BEHUS et BEHUL sur l'œdème de la patte induit par la carragénine. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=3) .....	106
Figure 5.21 : L'effet anti- inflammatoire des deux extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) et la vitamine E sur le taux des protéines carbonyles hépatiques chez les rats intoxiqués par l'hydrazine (300mg/kg) .....	108
Figure 5.22 : L'effet anti- inflammatoire des deux extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) et la vitamine E sur l'expression de l'activité de la MPO et le NO chez les rats intoxiqués par l'hydrazine (300mg/kg) .....	109
Figure 5.23 : L'effet anti- inflammatoire des deux extraits des deux extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) et la vitamine E sur le taux des cytokines TNF-a et IL-P dans la lésion hépatique induite par l'hydrazine (300mg/kg).....	112
Figure 5.24 : Micrographe de l'examen histopathologique (H & E x 40) .....	116

## Liste des tableaux :

Tableau 1.1 : Toxicité aigüe de l'hydrazine et son hydrate chez les rat et les souris .....	10
Tableau 3.1 : Liste des alcaloïdes pyrrolizidiniques des quelques espèces du genre <i>Heliotropium</i> .....	37
Tableau 3.2 : Liste des terpénoïdes identifiées d'espèces du genre <i>Heliotropium</i> . .....	38
Tableau 3.3 : Liste des flavonoïdes identifiés d'espèces du genre <i>Heliotropium</i> .....	39
Tableau 5.1 : Résultats du criblage phytochimique préliminaire de BEUHL .....	69
Tableau 5.2 : Résultats du criblage phytochimique préliminaire de BEUHS.....	69
Tableau 5.3 : Acides phénoliques et flavonoïdes identifiés dans les extraits BEUHL et BEUHS de l'espèce <i>H. undulatum</i> par HPLC-TOF/MS .....	74

# Table des Matières

Liste des abréviations .....	I
Liste des figures .....	IV
Liste des tableaux .....	VII
Résumé .....	XIV
Introduction générale .....	1

## I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre 1 :Hydrazines et ses dérivés

1.Les propriétés de l'hydrazine .....	7
2.Données pharmacologiques .....	8
3 .Toxicité de l'hydrazine .....	8
3.1. Toxicité aigüe de l'hydrazine .....	9
3.1. 1.Toxicité aigüe de l'hydrazine chez les Rongeurs : Rat et Souris .....	10
3.2. Toxicité chronique de l'hydrazine .....	11
3.2. L'hepatotoxicité par d'hydrazine .....	11

### Chapitre 2: Interaction de l'hydrazine avec les organites hépatiques

1.Interaction de l'hydrazine avec les mitochondries .....	16
1.1.les mitochondries.....	16
1.2. Le dysfonctionnement mitochondrial.....	17
1.2.1. Mitochondrie et stress oxydatif.....	17
1. 2.2.La membrane mitochondriale et la mort cellulaire.....	18
1.2.3. La toxicité mitochondrial par l'hydrazine .....	19
1.2.3.1. Les mégamitochondrie .....	19
2.Interaction de l'hydrazine avec les microsomes hépatiques .....	20

2.1. Les microsomes hépatiques.....	20
2.1.1. CYP2E1 .....	21
2.1.2. Mécanisme de la toxicité microsomale par l'hydrazine .....	22
2.2. Dérivés de l'hydrazine et intermédiaires réactives.....	22
2.3 CYP et stress oxydatif .....	26

### Chapitre 3: Plantes médicinales et hépatoprotection

1.Plantes médicinales et hépatoprotection.....	33
2. Aperçu bibliographique sur les espèces du genre Heliotropium.....	34
2.1. Présentation de la famille Boraginaceae .....	34
2.2. Présentation du genre Heliotropium.....	35
2.3.4. Habitats et distribution.....	35
2.3.5. Utilisation et intérêt des espèces du genre Heliotropium.....	35
5. Les métabolites secondaires les plus courants du genre Heliotropium.....	36
5 .1.1. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs).....	36
5. 2. Les terpénoïdes.....	38
5.3. Les flavonoïdes.....	38
6. Propriétés thérapeutiques et biologiques des espèces du genre Heliotropium.....	40
6.1. Activité anti-oxydante et anti-inflammatoire .....	40
7. La synergie des espèces du genre Heliotropium.....	40
8. Toxicité des espèces du genre Heliotropium .....	41

## II PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

### Chapitre 4: Matériels et méthodes

1. Etude chimique de l'espèce Heliotropium undulatum.....	47
1.1 Présentation de l'espèce.....	47
1.1.1. Choix de la plante.....	47

1.1.2. Description de l'espèce .....	47
1.1.3. Synonyme de l'espèce <i>H. undulatum</i> .....	48
1.1.4. Place dans la systématique.....	48
1.1.5. Utilisation en médecine traditionnelle.....	48
1.1.6. Travaux antérieurs sur l'espèce <i>H. undulatum</i> .....	49
1.2. Matériel végétal et screening phytochimique .....	49
1.2.1. La matière végétale.....	50
1.2.2. Préparation des extraits.....	50
1.3. Analyse qualitative des deux extraits (BEUHS et BEUHL).....	52
1.3.1 Screening phytochimique.....	52
1.3.1.1. Test chimique pour les alcaloïdes.....	52
1.3.1.2. Test chimique pour les tanins.....	52
1.3.1.3. Test chimique pour les saponines.....	53
1.3.1.4. Test chimique des flavonoïdes .....	53
1.3.1.5. Test chimique pour les stéroïdes.....	53
1.3.1.6. Test chimique des terpénoïdes (test de Salkowski).....	53
1.3.1.7. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	53
1.3.1.8. Papier Wathman.....	54
1.4. Analyse quantitative des deux extraits (BEUHS et BEUHL).....	56
1.4.1. Identification de composés phénoliques par HPLC/TOF-MS .....	56
2. Etude Biologique.....	57
2.1. Etude de l'activité antioxydante .....	57
2.1.1 Etude de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	57
2.1.1.1. Effet anti-radicalaire par le test DPPH° .....	57
2.1.1.2. L'activité de piégeage de radical Hydroxyl(°OH).....	57

2 .1. 1. 3. L'activité chélation du fer .....	57
2 .1. 1. 4. Détermination de pouvoir réducteur du Fer .....	58
2.1.2. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vivo</i> et hepatoprotective .....	58
2.1.2.1. Evaluation de la fonction hépatique.....	58
2.1.2.2. Marqueurs de l'hépatotoxicité .....	59
2.1.2.3. Evaluation du statut oxydatif cytosolique.....	59
2.1.2. 3.1.Détermination de la peroxydation lipidique (MDA) .....	60
2.1.2. 3.2.Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique .....	60
2.1.2.3.3. Dosage de l'activité enzymatique de superoxydedismutase (SOD) cytosolique .....	60
2.1.2.3.4. Dosage de l'activité du glutathion réduit (GSH) cytosolique .....	61
2.1.2.3.5. Dosage de l'activité du glutathion réductase (GR) cytosolique .....	61
2.1.2.3.6. Dosage de l'activité du glutathion-S-transférase (GST) cytosolique .....	61
2.1.2. 3.7.Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GPx) cytosolique.....	62
2.1.2. 4.Evaluation du dysfonctionnement mitochondrial <i>in vivo</i> .....	62
2.1.2. 4.1.Isolement des mitochondries du foie .....	62
2.1.2. 5. Evaluation de l'activité du CYP2E1.....	63
2.1.2. 5. 1. Préparation de la fraction microsomale.....	63
2.2. Etude de l'activité antioxydante .....	64
2. 3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de BEHU .....	64
2. 3. 1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de BEHU <i>in vitro</i> .....	64
2.3. 1.1. Détermination de l'effet de piégeage de radical d'oxyde nitrique (NO°).....	64
2.3. 1.2.Inhibition de la dénaturation des protéines: activité anti-arthritique .....	64
2.3. 1.3.Stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC).....	64
2. 4.Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de BEHU <i>in vivo</i> .....	65
2.4.1.Induction de l'œdème dans la patte par la carragénine.....	65

2.4.2. Détermination du taux en protéine carbonyle .....	65
2.4.3. Détermination de l'activité de la myéloperoxydase hépatique (MPO).....	66
2.4.4. Détermination du taux de l'oxyde nitrique (NO ) hépatique.....	66
2.4.5. Le dosage immuno-enzymatique pour l'estimation du taux de TNF- $\alpha$ et IL- $\beta$ .....	66
2.5. Etude histologique .....	67
2.6. Analyses statistiques.....	67

### III RESULTATS ET DISCUSSION

#### Chapitre 5: Résultats et discussion

1. Etude chimique de l'espèce <i>Heliotropium undulatum</i> .....	71
1.1. Analyse qualitative des extraits BEUHL et BEUHS.....	71
1.1.1. Screening phytochimique.....	71
1.1.2. Analyse par chromatographie sur couche mince.....	72
1.1.3. Carte phénolique sur papier Whattman.....	72
1.2. Identification et quantification des acides phénoliques et flavonoïdes par HPLC-TOF/MS .....	74
1.2.1. Analyse RP-HPLC des acides phénoliques et des flavonoïdes 1.2.1. Analyse RP-HPLC des acides phénoliques et des flavonoïdes des deux extraits BEUHL et BEUHS.....	74
2. Etude Biologique.....	77
2.1. Evaluation de l'activité antioxydante de la plante <i>H.undulatum</i> .....	77
2. 1. 1.Évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	77
2. 1. 1.1. Effet scavenger du radical DPPH. ....	77
2. 1. 1.2. L'activité de piégeage de radical hydroxyl ( $^{\circ}\text{OH}$ ).....	79
2. 1. 1. 3. Le pouvoir chélateur ferreux .....	80
2. 1. 1. 4. Le pouvoir réducteur du Fer.....	81
2. 1. 2.Évaluation de l'activité antioxydante <i>in vivo</i> .....	83
2. 1. 2.1. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vivo</i> et hépatoprotective.....	83

2. 1. 2.1.1. Marqueurs de l'hépatotoxicité .....	83
2. 1. 2.1.2. Evaluation du statut oxydatif cytosolique.....	85
2. 1. 2.1.2.1. Peroxydation lipidique (MDA).....	85
2. 1. 2.1.2.2. L'activité enzymatique de SOD et CAT cytosolique.....	86
2. 1. 2.1.2. 3. L'Activité enzymatique de système glutathion cytosolique.....	86
2. 1. 2.1. 3. Evaluation du statut oxydant mitochondrial.....	91
2. 1. 2.1. 3. Evaluation du dysfonctionnement microsomal.....	94
2. 2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de la plante <i>H.undulatum</i> .....	103
2. 2. 1.Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	103
2. 2. 1.1. L'effet de piégeage de l'oxyde nitrique NO° .....	103
2. 2. 1.2. Inhibition de la dénaturation des protéines : activité anti-arthritique .....	104
2. 2. 1.3. Stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC).....	106
2.2.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> .....	108
2.2.2.1. Détermination du volume de l'œdème de la patte induit par la carragénine.....	108
2.2.2.2. Evaluation du taux des protéines carbonyles hépatiques.....	110
2.2.2.3. Evaluation de L'activité de la MPO et le NO hépatique.....	101
2.2.2.4. Evaluation de taux des cyokines hépatiques, TNF- $\alpha$ et IL- $\beta$ .....	114
2.2.3. L'évaluation histopathologique .....	117
Conclusion générale et perspectives.....	125

## Annexes

## الملخص :

تساهم الدراسة الحالية في تبيين الأثر الوقائي للأجزاء الهوائية للنبته الصحراوية *Heliotropium undulatum Vahl* بتقييم كل من الأثر المضاد للأكسدة و المضاد للالتهاب لكل من المستخلصين البيتانوليين للأوراق السيقان لدى جرذان نموذجية عرضت للهيدرازين . تدلي الاختبارات *in vitro* (الكفاءةالاختزالية ، المخلبة ، الأسر الجذري) وكذا الدراسات *in vivo* (صيانة الكفاءة الوظيفية للكبد ، معادلةالإجهاد التأكسدي السيتوزولي و الميتوكوندري، تعديل نشاط الـCYP2E1) بأن مستخلص الأوراق أبلغ في تحقيق النشاط المضاد للأكسدة، بينما تدلي الاختبارات *in vitro* (الأثر المضاد للدنترة البروتينية، الحل العشائي ، أسر  $NO^{\circ}$ ) والدراسات *in vivo* الخاصة بالمسارات الالتهابية (CP ، MPO ، NO ،  $TNF-\alpha$  ،  $IL-1\beta$ ) بأن مستخلص السيقان قد سجل استجابة مرموقة في الحد من الالتهابات المستحدثة بالهيدرازين (300مغ/كغ). إن تعدد الآليات المضاد للأكسدة و للالتهاب التي يتمتع بها كل من المستخلصين قد تتناسب مع الطبيعة الكمية و النوعية للعديدات الفينول التي تم إدراجها بالـ HPLC وكذا بتأزر باقي المكونات .

**الكلمات الدالة :** *Heliotropium undulatum* ، الهيدرازين ، الكبد ، الاجهاد

التأكسدي ،الالتهاب ، الميتوكوندري ، CYP2E1 ، HPLC/MS.

## Résumé

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la valorisation de la partie aérienne d'une plante endémique collectée du Sahara algérien, *Heliotropium undulatum* Vahl (la famille des Boraginacées). Cette étude a été réalisée dans le cadre d'évaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des extraits n-BuOH des tiges et des feuilles de *H. undulatum* en utilisant un model rat-hydrazine. Les études *in vitro* (DPPH°, Chélation, FRAP, °OH) révèlent que l'extrait n-BuOH des feuilles est doté d'une propriété antioxydante. Les études *in vivo* également ont montré que l'extrait n-BuOH des feuilles à 200 mg/Kg a prouvé une activité hépatoprotectrice en préservant la fonction hépatique, en modulant la CYP2E1, en neutralisant le stress oxydant hépatique, et en assurant une protection de statut redox intra-mitochondrial manifesté durant le traitement par le l'hydrazine (300 mg/Kg). L'activité anti-inflammatoire s'est mieux prononcée par l'extrait n-BuOH des tiges dont la mise en évidence est effectuée en utilisant différents tests *in vitro* (dénaturation de l'albumine, HRBC, NO° scavenger). L'étude des voies modulatrices (les protéines carbonyles hépatiques, de MPO, les taux des NO, de l'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$ ) a confirmé le potentiel anti-inflammatoire *in vivo* de l'extrait n-BuOH des tiges. L'ensemble des mécanismes antioxydants et anti-inflammatoires concomitants caractérisant les deux extraits d'*Heliotropium undulatum* est corrélé à la nature qualitative et quantitative des acides phénoliques et des flavonoïdes révélés via l'analyse par l'HPLC-MASS et à l'effet synergétique de tous les phytoconstituants qui renferme cette plante.

**Mots Clés :** *Heliotropium undulatum*, Hydrazine, Foie Stress oxydant, Inflammation, Cyp2E1, Mitochondrie, HPLC/MS.

## Abstract

The work presented in this thesis contributes to the valorization of the aerial part of an endemic plant collected from the Algerian Sahara, *Heliotropium undulatum* Vahl (the family *Boraginaceae*). This study was conducted to evaluate the antioxidant and antiinflammatory activities of n-BuOH extracts of stems and leaves of *H. undulatum* using a rat- hydrazine model. *In vitro* studies (DPPH°, Chelation, FRAP, °OH) reveal that the n-BuOH extract of leaves has an antioxidant property. *In vivo* studies have also shown that the n-BuOH extract of 200 mg/kg leaves has demonstrated hepatoprotective activity by preserving liver function, modulating CYP2E1, neutralizing hepatic oxidative stress, and providing intra- mitochondrial redox status exhibited during treatment with hydrazine (300 mg/kg). The antiinflammatory activity was better pronounced by the n-BuOH extract of the stems, the demonstration of which is carried out using various *in vitro* tests (denaturation of albumin, HRBC, NO° scavenger). The study of modulatory pathways (hepatic carbonyl proteins, MPO, levels of NO, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) confirmed the *in vivo* anti-inflammatory potential of the n- BuOH extract of stems. The set of concomitant antioxidant and anti-inflammatory mechanisms characterizing the two extracts of *Heliotropium undulatum* is correlated with the qualitative and quantitative nature of the phenolic acids and flavonoids revealed via HPLC- MASS analysis and with the synergetic effect of all the phytoconstituents contained in this plant.

**Keywords:** *Heliotropium undulatum*, Hydrazine, liver, Oxidative stress, Inflammation, Cyp2E1, Mitochondria, HPLC/MS.

## Introduction générale

L'hydrazine et ses dérivés sont fréquemment retrouvés dans notre environnement [1,2]. Ils sont utilisés comme matières premières et/ou intermédiaires dans de nombreuses synthèses industrielles [3]. Anciennement, l'utilisation de l'hydrazine en médecine, est largement discutée, elle est limitée à un traitement curatif de l'hypertension et de la tuberculose. A nos jours, cette substance a été approuvée par ses effets thérapeutiques vis-à-vis à un nombre importants de cancers avancés [4,5]. En revanche, malgré son effet thérapeutique, et industriel, l'hydrazine peut engendrer des effets hépatotoxiques, qui font l'objet de nombreuses recherches. L'hépatotoxicité présente un effet indésirable majeur et remarquable de l'hydrazine [6], elle se manifeste principalement par un dysfonctionnement mitochondrial et microsomal [7,8].

Les mitochondries jouent un rôle central dans la vie et la mort des cellules et maintiennent l'homéostasie dans la cellule en interagissant avec les espèces réactives oxygène-azote et en répondant de manière adéquate aux différents stimuli [9]. Dans ce contexte, l'interaction de l'hydrazine avec les mitochondries est associée à une grande proportion d'anomalies [10]. De nombreuses molécules dérivées de l'hydrazine ont été considérées comme des inhibiteurs de la chaîne de transport d'électrons mitochondriaux, interférant avec un ou plusieurs complexes de la chaîne respiratoire. Certains d'autres peuvent conduire à un découplage de la phosphorylation oxydative [11], cette altération du dysfonctionnement conduisant à la toxicité mitochondriale induit le stress oxydatif mitochondrial et la production des radicaux libres qui conduit à la mort cellulaire [12].

Dans la littérature, les interactions de l'hydrazine avec les microsomes hépatiques initiées par le cytochrome P450, amplement discutées, concernent principalement les liens entre les taux de CYP2E1 et l'hépatotoxicité par l'hydrazine [8, 13]. En effet, le CYP2E1 est un déterminant clé de l'état redox cellulaire générant des radicaux libres, cette réaction est susceptible d'être amplifiée par de l'hydrazine [14, 15, 16]. Dans cette optique, de nombreux tentatives et essais thérapeutiques ont été avancés dont le but de combattre les effets néfastes du dysfonctionnement mitochondrial et microsomal hépatocytaire. Les recherches actuelles parlent des stratégies pharmacologiques de la modulation de ces dysfonctionnements restent malheureusement défectueuses [17].

De nombreuses études ont révélé qu'une augmentation du stress oxydatif tel la production des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endogène peut se résulter en dommages des membranes lysosomales et

mène à un effondrement du potentiel membranaire mitochondrial. Ces résultats impliquent le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, médiateur cellulaire de l'inflammation comme une caractéristique importante de l'inflammation induite par l'hydrazine, qui entraîne une cascade de réactions radicalaires pathologiques et produisent les radicaux libres oxydants.

La toxicité de l'hydrazine est également en cause, en tant que facteur de risque potentiel de manifestation de réactions indésirables aux médicaments, en particulier celles provoquées par les médicaments contenant de l'hydrazine [4]. Les échecs des mécanismes de défense antioxydants endogènes favorisent la formation des radicaux libres excessifs et les dommages tissulaires conséquents [10].

Récemment, les produits à base de plantes ont attiré l'attention comme des composés thérapeutiques et protecteurs naturels actifs utilisés dans la médecine alternative. Il est rapporté qu'un pourcentage important de la population dépend des médicaments de dérivés naturels comme une source de substances bioactives pour maintenir leur santé [18]. Le développement des méthodes analytiques, pharmacologiques et cliniques a permis à la phytothérapie de faire ses preuves scientifiques sur la qualité, et l'efficacité des plantes médicinales [19]. L'Algérie, avec ses milliers d'hectares de forêt et de pâturage, regorge de plantes condimentaires et médicinales qui sont encore méconnues et mal exploitées. En Algérie, l'industrie pharmaceutique, et également des médecins, des biologistes et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. [20].

De nos jours, la découverte de nouveaux médicaments semble de se concentrer sur leurs origines végétales. Les médicaments à base de plantes jouent un rôle important dans la régénération des cellules notamment hépatiques et l'accélération de leurs processus de guérison et par conséquent, la gestion de nombreux troubles du foie [21]. Il existe un nombre considérable de plantes pourrait être considéré comme une mine d'or pour prévenir aux agents hépatotoxique. A la lumière de ces données, notre investigation est consacrée à l'étude phytochimique et hépatoprotectrice d'une espèce *Heliotropium undulatum* (Boraginaceae) en tant que sources de composés naturelles actives. Une étude chimique antérieure des espèces de genre *Heliotropium* a montré qu'elles sont riches en flavonoïdes, terpénoïdes, stéroïdes, alcaloïdes, saponines et tanins [9] ; et révèlent une puissante activité de piégeage des radicaux libres [22]. Des rapports antérieurs a indiqué également que ce genre présente de nombreuses activités telles que des activités anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques [23, 24,

[25]. Sachant que le piégeage des radicaux libres et les activités anti-inflammatoires sont des facteurs critiques impliqués dans la modulation du dysfonctionnement hépatique, la présente étude est basée sur la découverte des agents thérapeutiques naturellement dérivés ayant un effet hépatoprotecteur et permet de discerner les hypothèses aidant à conduire la relation structure/effet de cette espèce, ainsi que ses molécules incluses dans la modulation du dysfonctionnement mitochondrial/microsomale induit par l'hydrazine.

Notre investigation s'intéresse particulièrement à étudier les effets modulateurs de la plante de la phase butanolique des tiges (BEHUS) et des feuilles (BEHUL) de l'espèce *Heliotropium undulatum* vis-à-vis le dysfonctionnement mitochondrial/microsomal hépatocytaire et les altérations inflammatoire chez le rat traité par l'hydrazine. Selon la littérature, peu d'études biologiques ont été réalisé avec l'espèce *H. undulatum*.

Cette étude explore la plante *H. undulatum* en tant que sources de substances naturelles actives dont la connaissance de leurs structures chimiques permettrait d'envisager les hypothèses aidant à déterminer l'interaction de ces composés avec les mécanismes impliqués dans la modulation du dysfonctionnement mitochondrial/lysosomal induit par l'HD. Afin d'atteindre les objectifs conçus par notre hypothèse de travail nous avons adopté la démarche suivante :

- Etude chimique : extraction, criblage phytochimique préliminaire et analyse qualitative et quantitative en utilisant l'analyse par CCM, et par chromatographie Chromatogrammes HPLC-MS, afin de déterminer le profile chimique de la plante *H. undulatum*.
- Etude biologique: valorisation du potentiel biologique antioxydant et anti-inflammatoires de la plante *H. undulatum* :
- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits BEHUS et BEHUL sur des modèles *in vitro*.
- Evaluation de l'activité antioxydante hépatocytaire *in vivo* (fonction hépatique, statut oxydatif cytosolique/statut oxydatif mitochondrial, CYP2E1) des extraits BEHUS et BEHUL sur le modèle rat exposé a l'HD.
- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits BEHUS et BEHUL sur des modèles *in vitro*.

- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* (caragénine, protéine carbonylée, MPO, TNF- $\alpha$ , IL-B) des extraits BEHUS et BEHUL sur le modèle rat exposés à l'HD.
- Evaluation histopathologique
- Les comparaisons statistiques des moyennes en utilisant le test t de Student.

## Références bibliographiques

- [1] Toth B, Actual new cancer-causing hydrazines, hydrazides, and hydrazones. *J Cancer Res ClinOncol*, 1980; 97: 97-108
- [2] De Flora S, Znacchi P, Bennicelli C, Camoirano, A, Cavanna M, et al. In vivo and in vitro genotoxicity of three antihypertensive hydrazine derivatives (hydralazine, dihydralazine, and endralazine). *Environ Mutagen*, 1982; 4: 605-619.
- [3] Arce C, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Candelaria M. Hydralazine target: from blood vessels to the epigenome. *J Transl Med* , 2006; 4: 10
- [4] Tafazoli S, Mashregi M, O'Brien PJ. Role of hydrazine in isoniazid-induced hepatotoxicity in a hepatocyte inflammation model. *ToxicolApplPharmacol*, 2008;(229): 94–101.
- [5] Sarich TC, Youssefi M, Zhou T, Adams SP, Wall RA, Wright JM. Role of hydrazine in the mechanism of isoniazid hepatotoxicity in rabbits. *Arch Toxicol*, 1996; 70:835-840.
- [6] Sendo T, Noda A, Ohno K, Goto S, Noda H. Hepatotoxicity of hydrazine in isolated rat hepatocytes. *Chem. Pharm. Bull*, 1984; 32: 795.
- [7] Yu-Zhao Ran,<sup>a</sup> Hao-Ran Xu,<sup>a</sup> Kun Li, <sup>a</sup> Kang-Kang Yu,<sup>a</sup> Jin Yanga and Xiao-Qi Yu. Development of a mitochondria-targeted fluorescent probe for hydrazine monitoring in living cells. *RSC Advances*, 2016; 87, 120.
- [8] Jenner AM, Timbrell JA. Influence of inducers and inhibitors of cytochrome P450 on the hepatotoxicity of hydrazine in vivo. *Arch Toxicol*, 1994; 68: 349–357.
- [9] Scatena R. Mitochondria and drugs. *Adv Exp Med Biol*, 2012; 942:329-346.
- [10] Antosiewicz J, Nishizawa Y, Liu X, Usukura J, Wakabayashi T. Suppression of the hydrazine-induced formation of megamitochondria in the rat liver by alpha-tocopherol. *Exp Mol Pathol*. 1994; 60(3):173-187.
- [11] Kang KwangLee Urs A. Boelsterl. Bypassing the compromised mitochondrial electron transport with methylene blue alleviates efavirenz/isoniazid-induced oxidant stress and mitochondria-mediated cell death in mouse hepatocytes. *Redox Biology*. 2014; 2: 599-609.
- [12] Krähenbühl S. Alterations in mitochondrial function and morphology in chronic liver disease: Pathogenesis and potential for therapeutic intervention. *Pharmacology & Therapeutics*, 1993; 60(1): 1-38.
- [13] Mitchell JR, Zimmerman HJ, Ishak KG, Thorgeirsson UP, Timbrell JA, et al. Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. *Ann Intern Med*, 1976; (84): 181-192.

- [14] Caro AA, Cederbaum AI. Role of phospholipase A2 activation and calcium in CYP2E1-dependent toxicity in HepG2 cells. *J BiolChem*, 2003; 278: 33866–33877.
- [15] Caro AA, Cederbaum AI: Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev PharmacolToxicol*, 2004; 44:27–42.
- [16] Delaney J, Timbrell JA. Role of cytochrome P450 in hydrazine toxicity in isolated hepatocytes in vitro. *Xenobiotica*, 1995;25:1399– 1410.
- [17] Sreenivas Avula,1 Sumit Parikh, MD,1 Scott Demarest, MD,2 Jonathan Kurz, MD,2 and Andrea Gropman, MD2. Treatment of Mitochondrial Disorders. *Curr Treat Options Neurol*. 2014; 16(6): 292.
- [18] Biljana Bauer Petrovska. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev*. 2012 ; 6(11): 1–5.
- [19] Brito AR. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. *J Ethnopharmacol*. 1996; 54(2-3):131-138.
- [20] D. Miara Email M. Ait Hammou S. Hadjadj Aoul. Phytothérapie et taxonomie des plantes médicinales spontanées dans la région de Tiaret (Algérie). *Phytothérapie* 2013, 11(4) : 206–218.
- [21] Eduardo Madrigal-Santillán, Eduardo Madrigal-Bujaidar, Isela Álvarez-González, María Teresa Sumaya-Martínez. Review of natural products with hepatoprotective effects. *World J Gastroenterol*. 2014; 28; 20(40): 14787–14804.
- [22] Alejandro urzua, Brenda modak , Rene torres Bol. Identification of new aromatic geranyl derivative in the resinous exudate of *heliotropium filifolium* (Boraginaceae). *Soc. Chil. Quím*. 46. 2001.
- [23] Jain SC, Singh B, Jain R, Dubey MM. Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. *Fitoterapia*. 2001; 72: 666-668.
- [24] B. Singh, M. M. Dubey . Estimation of triterpenoids from *Heliotropium marifolium* Koen, ex Retz In vivo and In vitro. I. Antimicrobial screening. *Phytother Res* 2001; 15:231-4.
- [25] Dash G K and Murthy P N. Studies on Wound Healing Activity of *Heliotropium indicum* Linn. Leaves on Rats *Pharmacology*, 2011 ; 8-18.

Première Partie  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

# Chapitre 1

## Hydrazines et ses dérivés

### 1. Les propriétés de l'hydrazine

L'hydrazine est un liquide incolore, hygroscopique, fumant à l'air et d'odeur aminée caractéristique (odeur ammoniaquée, seuil olfactif : 3 à 4 ppm) [1,2]. Cette substance est très soluble dans l'eau et dans les alcools, les amines et liquides ammoniaqués ; avec l'eau, l'hydrazine anhydre forme un azéotrope à 68 % (en poids) d'hydrazine qui bout à 120,5 °C. Son hydrate principal, qui contient 64 % en poids d'hydrazine, peut exister à l'état solide et à l'état liquide. Dans les conditions normales, c'est un liquide incolore légèrement huileux. Le degré de pureté de l'hydrazine anhydre est de 93 - 100 %. La constante de dissociation (Pka) de l'hydrazine anhydre est de 8,1 à 25 °C [3]

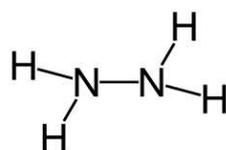


Figure 1.1 : Molécule d'hydrazine N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> [4].

L'hydrazine est bien connu en raison de ses applications dans les industries chimiques, pharmaceutiques et agricoles ; ainsi que dans l'industrie aérospatiale : fuels pour fusées [5]. Les dérivés de l'hydrazine sont aussi présents naturellement dans certains champignons [6,7]. Il est principalement utilisé comme réducteur pour le conditionnement des circuits secondaires des centrales nucléaires et comme stabilisateur de chaleur [8]. D'autres utilisations comprennent en tant qu'intermédiaire chimique pour la synthèse, en tant que stabilisant pour des additifs pour carburants de peroxyde organique, en tant que absorbant pour les gaz acides, en tant qu'agent de contrôle de la croissance des plantes [9,8]. L'hydrazine est également un métabolite de deux importants médicaments, l'isoniazide, et l'hydralazine [10].

L'exposition à l'hydrazine est donc avant tout professionnelle, dans l'ensemble des activités industrielles la mettant en œuvre au niveau des centrales thermiques [11]. La population potentiellement pourrait être exposée par l'ingestion des résidus présents dans les aliments traités avec l'hydrazine ou ses dérivés. Le 1,1-diméthylhydrazine a été identifié comme un

produit d'hydrolyse du daminozide en fruits transformés. Daminozide est plus inscrit destiné à être utilisé sur les plantes alimentaires aux Etats-Unis [12]. L'hydrazine a été également détectée dans les produits du tabac à des concentrations allant jusqu'à 147 ng/g [9,11].

## 2. Données pharmacologiques

L'hydrazine est rapidement absorbée à travers la peau, par inhalation ou par ingestion, puis distribuée dans les tissus, principalement au niveau des reins [13]. la pénétration cutanée est importante puisque l'hydrazine apparaît dans le plasma 30 secondes après une application sur peau saine [14]. À la suite de l'administration d'une dose unique d'hydrazine à des rats par voie orale (3 à 81 mg/kg), au moins 19 à 46 % de la dose administrée est absorbée après 24 heures. Cette estimation se base sur les quantités d'hydrazine et de métabolites, excrétées dans les urines [15].

Les multiples voies de métabolisation d'hydrazine qui existent conduisent à la formation de métabolites majoritairement excrétés via les urines (acétyl- et diacétylhydrazine). L'élimination de l'hydrazine peut aussi se faire sous forme inchangée dans les urines ou d'azote dans l'air expiré [16]. La N-oxydation de l'hydrazine ou de ses dérivés acétyles qui aboutissent à la formation de l'urée et de l'ammoniaque, éliminés par voie urinaire, et à l'azote gazeux  $N_2$  éliminé par voie respiratoire [17]. Il subit une transformation en divers composés hydrolysables par action du système des mono-oxygenases et du cytochrome P450 [18]. L'hydrazine et ses dérivés détectés dans les urines ne représentent qu'une fraction de 30 à 40 % de la totalité de l'hydrazine absorbée. Un point fondamental à retenir : la N-acetyltransférase 2 (NAT2) impliqué dans le métabolisme de l'hydrazine est sujette à une importance variabilité génétique. Cette enzyme est codée par un gène du chromosome 8p22, soumis à un intense polymorphisme (figure 1.2). Cela différencie trois catégories d'individus : Les acétyleurs lents, chez lesquels la demi-vie urinaire est de  $3,94 \pm 1,7$  heures, les acétyleurs intermédiaire chez lesquels la demi-vie urinaire est de  $2,25 \pm 0,37$  heures acétyleurs rapides chez lesquels la demi-vie urinaire est de  $1,86 \pm 0,67$  heures [19].

## 3. Toxicité de l'hydrazine

L'Hydrazine se décompose sous l'action de la chaleur et/ou des UV, en azote et hydrogène. Les réactions de dégradation dans l'air sont très rapides : en une heure, 50 % de la quantité initiale d'hydrazine est transformée et 94 % en 4 heures. Cette réaction d'auto-oxydation peut être violente et les limites d'explosivité de l'hydrazine dans l'air sont 4,7 % (limite inférieure) et 100 % (limite supérieure). En atmosphère polluée, la demi-vie de l'hydrazine est estimée à

quelques minutes [10]. L'hydrazine et ses dérivés présentent des tensions de vapeur suffisamment élevées pour constituer un sérieux risque sanitaire en cas d'inhalation. Leur odeur ammoniacale qui rappelle celle du poisson est suffisamment répulsive pour indiquer la présence de concentrations dangereuses en cas de brèves expositions accidentelles. [20].

L'hydrazine est toxique quelle que soit la voie d'intoxication [21,22]. Par voie orale, la dose létale 50 % est de 60 mg.kg-1 chez la souris ou le rat. Par voie percutanée elle passe à 93 mg.kg/1 chez le cobaye. Par inhalation pour une exposition de 4 heures la concentration létale 50 % est de 250 ppm (328 mg.m-3) chez la souris et 570 ppm (747 mg.m-3) chez le rat. Les données expérimentales animales ont permis d'extrapoler à l'homme et de définir, en cas d'exposition par voie aérienne, des seuils d'effets létaux et des seuils d'effets réversibles (figure 1.2) [14].

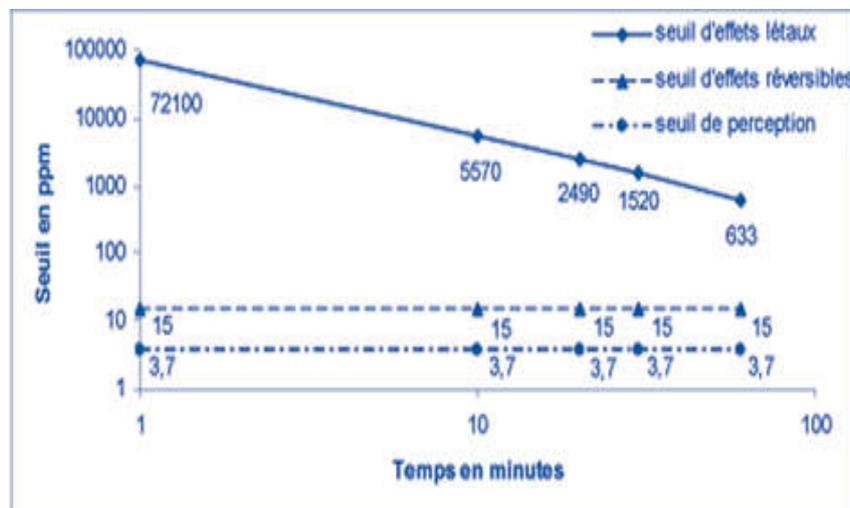


Figure 1.2: Seuils de toxicité aiguë de l'hydrazine par inhalation pour un temps d'exposition de 1, 10, 20, 30 et 60 minutes (facteur de conversion 1 ppm = 1,31 mg.m<sup>3</sup>)[14].

### 3.1. Toxicité aiguë de l'hydrazine

l'intoxication aiguë de l'hydrazine par voie orale ou par inhalation, se traduit essentiellement par une atteinte neurologique; une hypoglycémie qu'une acidose métabolique sont souvent présentes. Par les suites, on peut observer une hémolyse et une atteinte hépatique cytolitique, elles sont lentement régressives selon la voie d'entrée ; on note en plus des troubles digestifs ou respiratoires liés à un effet direct de la substance [23]. Localement, les projections d'hydrazine sous forme liquide peuvent provoquer des lésions cutanées ou oculaires sévères [24]. La littérature disponible suggère que l'insuffisance hépatique aiguë est l'élément probable pour l'étiologie de la létalité aiguë. L'intégrité cellulaire est affectée par le stress

oxydatif lorsque la production d'oxydants actifs submerge les mécanismes de défense anti-oxydante [25].

### 3.1. 1. Toxicité aiguë de l'hydrazine chez les Rongeurs : Rat et Souris

La plupart des études de détermination de la toxicité aiguë ( $DL_{50}$ ,  $CL_{50}$ ) sont effectuées sur les animaux de laboratoire. Les principaux résultats recueillis pour les rats et les souris sont reportés dans le (tableau 1.1) :

Tableau 1.1 : Toxicité aiguë de l'hydrazine et son hydrate chez les rat et les souris [8].

	Voie d'administration	Souris	rat
	Orale $LD_{50}$ mg/kg	59	60-90
	Inhalation $IC_{50}$ ( $mg/m^3$ )	330 exposition pendant 4h	350-670 : exposition pendant 4h 4200 : exposition pendant 1h
hydrazine	Intra-vineuse $LD_{50}$ (mg/kg)	57	55
	Intra-péritonéale $LD_{50}$ (mg/kg)	62-156	59
Hydrazine hydrate	Orale $LD_{50}$ (mg/kg)	83	129
	Intra-peritoneale $LD_{50}$ (mg/kg)	56	80-100

A  $75 mg/m^3$  (57 ppm), l'analyse des activités réflexes des animaux montre dans un premier temps une stimulation liée à l'irritation. L'action centrale se manifeste ensuite par une diminution des réactions motrices et une augmentation des temps de latence. Cinq à 7 jours après l'exposition, un retour à un état normal des fonctions nerveuses est enregistré. A  $20 mg/m^3$  (15 ppm), l'augmentation de l'irritabilité du système nerveux est encore observée et est réversible à l'arrêt de l'exposition. Des concentrations de  $5$  à  $8 mg/m^3$  (4 à 6 ppm) n'entraînent aucune modification comportementale [26]. Dans une étude réalisée sur des rats F344 mâles et femelles et des hamsters, exposés à 750 ppm d'hydrazine pendant 60 minutes révèle des lésions de l'épithélium nasal transitionnel sont enregistrées : nécrose minime, exfoliation modérée, inflammation aiguë modérée et 'apoptose) [20].

### 3.2. Toxicité chronique de l'hydrazine

À la suite d'une exposition continue pendant 6 mois les effets hématologiques découlent à l'évidence de l'activité hémolytique. La phénylhydrazine provoque une hyperplasie de la moelle osseuse et une production extramédullaire de globules rouges. La méthylhydrazine est un puissant formateur de méthémoglobine, et des pigments sanguins sont excrétés dans l'urine [27]. Les sujets souffrant d'une carence congénitale de glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PDH) sont beaucoup plus sensibles aux effets hémolytiques de la phénylhydrazine et ne devraient pas être exposés à ce composé [28]. Cette toxicité est majorée chez les acétyleurs lents qui possèdent un génotype déterminé de la NAT2 (N-acétyltransférase) [10]. La toxicité générale des différentes hydrazines varie largement au niveau des organes cibles [29].

### 3.2. L'hepatotoxicité par d'hydrazine

D'après la littérature le HD interfère dans une large gamme de réactions physiologiques. Cependant, un profil toxicologique complet et le mécanisme de toxicité HD ne sont pas encore entièrement compris [10]. Le mécanisme d'action toxique de l'hydrazine et de ses dérivés est connu grâce à la toxicité des champignons responsables du syndrome gyromitrien ou helvellien et à celle d'un médicament antituberculeux l'isoniazide qui est une hydrazide de l'acide isonicotinique. La gyromitrine, retrouvée dans les gyromitres (fausse morille...) et les helvelles (mitre d'évêque), est une hydrazone toxique par l'un de ses métabolites : la monométhylhydrazine (MMH). La MMH est ensuite métabolisée par acétylation hépatique. D'autre part, une activation métabolique hépatique conduit à la formation de diazonium générateurs de radicaux libres très réactifs [30].

Le métabolisme de l'hydrazine est complexe et reste, malgré de nombreuses études, assez mal connu [10]. La N-acétylation, en tant que processus de détoxication qui conduit à l'acétylhydrazine puis à la diacétylhydrazine beaucoup moins toxique que le produit de départ; cette réaction, catalysée par une acétylase, existe chez le lapin, la souris et le rat. L'hydrazine peut aussi être oxydée en azote sous l'action d'oxygénases hépatiques [31]

Plusieurs études montrent que des voies multiples, à la fois enzymatiques et non enzymatiques, semblent être impliqués dans la production de ERO. Preuve de la production de radicaux, y compris un groupe méthyle, un groupe acétyle, un groupe hydroxyle, et les radicaux hydrogène, a été observé au cours du métabolisme de HD [7, 26, 32]. Des études expérimentales ont révélé que l'ajout de HD au hepatocytes peut induire une formation accrue

de ERO par le dysfonctionnement des mitochondries et/ou d'appauvrissement ou d'inhibition de systèmes antioxydants. L'augmentation de la production de ERO par HD est susceptible de contribuer à un stress oxydatif qui peut finalement conduire à l'hépatotoxicité [31,33]. Les ERO peuvent induire une toxicité cellulaire soit par liaison covalente aux macromolécules ou en initiant un processus auto-oxydatif tels que la peroxydation lipidique *in vivo* [29,31].

Les effets hépatiques chez les souris, inhalant 0,2 ppm d'hydrazine en continu pendant 6 mois sont principalement à type de dégénérescence graisseuse; ils peuvent conduire à une nécrose et une accumulation de triglycérides dans le foie sous forme d'une stéatose [18] qui sont généralement réversibles dans le cas des hydrazines utilisées comme propergol [1]. À la suite d'une exposition des rats durant un an, 5 jours par semaine, 6 heures par jour, une atteinte hépatique est aussi manifestée par une prolifération des voies biliaires, hémossidérose et une amylose [27]. La cytolysse hépatique induite par l'HD pourrait être traduite par une augmentation de l'activité plasmatique des valeurs de l'ASAT, ALAT, gamma-GT, phosphatase alcaline, GLDH et LDH [25]. Une atteinte métabolique pourrait conduire à une acidose et à une hypoglycémie [27]. Il a été rapporté que l'exposition humaine au HD provoque la toxicité en interférant avec un certain nombre de processus métaboliques tels que la néoglucogenèse et de la glutamine synthétase [19, 22, 28, 34,35] à côté d'une méthylation de l'ADN [36].

## Références bibliographiques

- [1] Schmidt E.W., Hydrazine and Its Derivatives: Preparation, Properties and Applications. Wiley, 1984.
- [2] Lambert CE. Schardt H. Thierolf F. Krause . Reference Module in Biomedical Sciences. from Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), 2014, 953-956.
- [3] INRS. Hydrazine, hydrated'hydrazine et solutions aqueuses .Fiche toxicologique n°21, 2013 ; 1-3.
- [4] Hydrazine, hydrate d'hydrazine et solution aqueuses. Fiche toxicologique n° 21. INRS.1997.
- [5] Shahi I R, Guptaa N, Bhallaa V, Kaurb D, Arorab S, Kumara M. A charge transfer based ratiometric fluorescent probe for detection of hydrazine in aqueous medium and living cells. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016; 222: 923-929.
- [6] Robert R.lauwerys toxicologie indistrieelleet intoxication professionnelles 4<sup>eme</sup> edition masson, 2007 .ISBN 10 : 2294014189
- [7] Benvidi A, Jahanbani S, Akbari A, Zare R. Simultaneous determination of hydrazine and hydroxylamine on a magnetic bar carbon paste electrode modified with reduced grapheme oxide/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and a heterogeneous mediator. Electroanalytical Chemistry, 2015; 758: 68-77.
- [8] Hazard assesment report hydrazine Chemical evaluation and rechearch institute (CERI), 2007.
- [9] Nicholas E.Preecea, Jeremy K.Nicholson, John A.Timbrella. Identification of novel hydrazine metabolites by 15N-NMR. Biochemical Pharmacology, 1991 ; 41(9) :1319-1324.
- [10] Michiels F, Deslauriers M, Nicolas A. La biométrieologie de l'hydrazine : intérêt, limites et place dans la démarche de prévention du risque. Arch Mal Prof Env, 2008; 69: 455-63.
- [11] Tissot S, Verrhiest G, Pichard A. Seuils de toxicité aiguë en cas d'émissions atmosphériques accidentelles de substances chimiques dangereuses : méthode de détermination et principaux résultats. Environnement, Risques & Santé, 2004 ; 3(5) :304-310.
- [12] Melanie Johns, Cupp, Timothy S, Tracy. Dietary supplements: toxicology and clinical pharmacology.Humana Press, 2003; 126(1): 364-365.
- [13] ACRO. Expertise du dossier de déclaration de modifications relatives aux rejets et aux prélèvements d'eau du C.N.P.E. de Belleville-sur-Loire, 2013 ; 2-59.
- [14] Millet, C Renard, E Strat, P Burnat. Hydrazine : un risque chimique d'actualité. Cas d'une fuite impliquant un aéronef de type F-16. C. médecine et armées, 2009; 37(4): 291-296.

- [15] Sougata Sinha, Pankaj Gaur, Sagarika Dev, Subhrakanti Mukhopadhyay, Trinetra Mukherjee, Subrata Ghosh. Hydrazine responsive molecular material: Optical signaling and mushroom cell staining. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015; 221: 418-426.
- [16] Barrows, L.R, Shank, R.C. and Magee, PN. S-Adenosylmethionine metabolism and DNA methylation in hydrazine-treated rats. *Carcinogenesis*, 1983; 4, 953-957.
- [17] Eto S, Noda H, Minemoto M, Noda A. Effect of safrazine, a monoamine oxidase inhibitor bearing a hydrazine-terminal, on phenytoin metabolism in isolated rat hepatocytes. *Chem Pharm Bull*, 1988; 36(1): 456-8.
- [18] Jenner, H.S. and Timbrell, J.A. (1990) Hydrazine metabolism in rat liver microsomes. *Human Exp. Toxicol.*, 9, 335-336.
- [19] Kleineke J, Peters H, Söling HD. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by phenethylhydrazine (phenelzine). *Biochem Pharmacol*, 1979; 15; 28(8):1379-1389.
- [20] Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec Détermination de l'hydrazine : méthode colorimétrique, 2014.
- [21] Leakakos, T. and Shank, R.C. Hydrazine genotoxicity in the neonatal rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 1994 ; 126, 295-300.
- [22] Noda et al Noda A, Sendo T, Ohno K, et al. Metabolism and cytotoxicity of hydrazine in isolated rat hepatocytes. *Chem Pharmacol Bull*, 1987; 35:2538-2544.
- [23] Protreau J P, Lim P et Labat R. toxicite d'un derive bi-azote, l'hydrate d'hydrozine pour carassius L. et rutilus L. et differents stades du developpement du brachdanio rerio H B. *Annlis Limnoi*, 1979 ; 15 (3) : 337-346.
- [24] Melissa A, Runge-Morris S. Characterization of hydrazine-stimulated proteolysis in human erythrocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1988; 94(3): 414-426.
- [25] Becker, R.A., Barrows, L.R. and Shank, R.C. Methylation of liver DNA guanine in hydrazine hepatotoxicity; dose-response and kinetic characteristics of 7-methylguanine and O 6-methylguanine formation and persistence in rats. *Carcinogenesis*, 1981 ; 2 : 1181-1188.
- [26] Runge-Morris MA, Iacob S, Novak RF. Characterization of hydrazine-stimulated proteolysis in human erythrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1988; 94(3): 414-26.
- [27] Schardt F, Trierolf H, Krause F. L'effet hépatotoxique de l'hydrazine. *Arch Mal Prof Env*. 2005: 494-7.
- [28] Willis JE. The substitution of 1-methylhydrazine for ammonia in the glutamine synthetase system. *Biochemistry*, 1966; 5(11): 3557-63.

- [29] Choudhary D, Srivastava M, Sarma A, Kale RK. Effect of high linear energy transfer radiation on biological membranes. *Radiat Environ Biophys*, 1998; 37(3):177-85.
- [30] Rozwarski DA, Grant GA, Barton DH, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 1998; 279(5347):98-102.
- [31] Preece et Timbrell JA, Preece NE, Nicholson JK. Identification of novel hydrazine metabolites by <sup>15</sup>N-NMR. *Biochem Pharmacol*, 1991; 9: 1319-1324.
- [32] Noda A, Noda H, Misaka A, Sumimoto H, Tatsumi K. Hydrazine radical formation catalyzed by rat microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988; 153(1): 256-260.
- [33] Loft S, Poulsen HE. Markers of oxidative damage to DNA: antioxidants and molecular damage. *Methods Enzymol*, 1999; 300: 166-84.
- [34] Kaneo et al Kaneo Y, Iguchi S, Kubo H, et al. Tissue distribution of hydrazine and its metabolites in rats, *J Pharmacobiodyn*, 1984; 7:556-562.
- [35] Sendo T, Yamashita C, et al. Brain distribution of hydrazine and its GABA elevating effect in rats. *J Pharm Dyn*, 1983 ; 6:136-138.
- [36] Bosan WS, Shank RC, MacEwen JD, et al. Methylation of DNA guanine during the course of induction of liver cancer in hamsters by hydrazine or dimethylnitrosamine. *Carcinogenesis*, 1987 ; 3:439-444.

## Chapitre 2

# Interaction de l'hydrazine avec les organites hépatiques

### 1. Interaction de l'hydrazine avec les mitochondries

#### 1.1. les mitochondries

Les mitochondries sont des organites omniprésents trouvés dans presque toutes les cellules eucaryotes. Leur fonction principale est de fournir l'énergie chimique nécessaire pour la biosynthèse et l'activité motrice de la cellule. [1, 2]. La chaîne de transport se compose d'environ 80 polypeptides différents, qui sont organisées en cinq protéines transmembranaires les complexes (I-V). Le gradient de protons généré par les complexes I, III et IV est libéré par l'ATP synthase ou le complexe V, ce qui se traduit par la phosphorylation d'adénosine diphosphate (ADP) à ATP [3]. Les mitochondries sont connues comme centre de signalisation métabolique des cellules, elles effectuent de nombreuses fonctions biologiques importantes telles la régulation de l'apoptose, l'entretien de l'homéostasie calcique de cytosol, la biosynthèse lipidique. . Le métabolisme du fer et du soufre sont la principale source des espèces d'oxygène réactif (ERO), qui peuvent influencer la voie de signalisation homéostatique [4]. Les mitochondries jouent un rôle essentiel dans la génération la plupart de l'énergie de la cellule comme ATP grâce à la dégradation par oxydation de substrats endogènes, tels que le pyruvate (généralisé à partir glycolyse), des acides gras et des acides aminés [5].

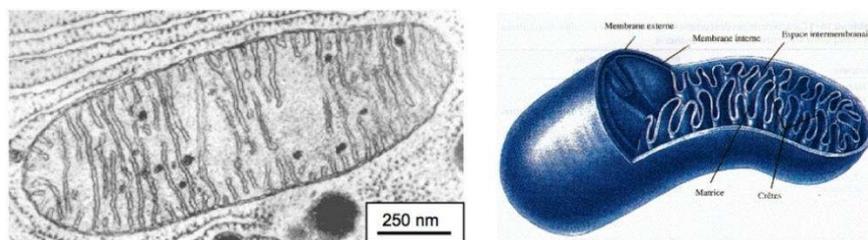


Figure 2.1 : Représentation schématique de la structure mitochondriale (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Mitochondrie>)

## 1.2. Le dysfonctionnement mitochondrial

La dysfonction mitochondriale induite par une substance toxique peut être due à la substance elle-même et/ou à des réactifs métaboliques générés par le métabolisme du cytochrome P450 [6]. Le dysfonctionnement mitochondrial est un terme générique qui inclut la modification des différentes voies métaboliques et des dommages aux composants mitochondriaux. De plus, ces troubles mitochondriaux peuvent avoir diverses conséquences néfastes, telles le stress oxydatif, le manque d'énergie, l'accumulation de triglycérides (stéatose) et la mort cellulaire [7].

### 1.2.1. Mitochondrie et stress oxydatif

La mitochondrie est la source de la production d'une grande quantité des espèces oxygénées réactives ou ERO cellulaires. La formation de ces ERO mitochondriales est en relation du fonctionnement de la chaîne respiratoire. En effet, une fuite d'électrons peut intervenir et réduire partiellement l'oxygène matriciel pour aboutir à la formation de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ . 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 [8]. D'autre part Liu *et al.* [9] 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  $NADH$  [9]. Les travaux de Seifert *et al.* [10] ont montré que la  $\beta$ -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 [11]. La  $\beta$ -oxydation des acides gras et l'oxydation du glucose peuvent induire une production de ERO probablement en augmentant la quantité d'équivalents réduits ainsi que le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire [12]. 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 cytochrome b5 réductase au niveau de la membrane externe mitochondriale et l'aconitase dans la matrice [13]. L'ADNmt est extrêmement sensible à l'oxydation et des dommages en raison de sa proximité de la membrane interne, l'absence d'une protection d'histones, et les mécanismes de réparation sont incomplets dans les mitochondries [14]. Des mutations dans l'ADNmt conduisent progressivement à l'augmentation des protéines ETC anormales, au dysfonctionnement mitochondrial, et aux dommages à la partie du mécanisme de transport d'électrons ; par la suite une altération des protéines OXPHOS, cardiolipine et ADNmt, provoquant ainsi un stress oxydant créant un cercle vicieux [9]. Normalement, les mitochondries possèdent un système antioxydant qui empêche le déséquilibre d'oxydation dans le rapport prooxydant/antioxydant, par exemple, le manganèse superoxyde dismutase (MnSOD), qui balaye le superoxyde produit par le système de transport des électrons dans les mitochondries [15].

### 1. 2.2.La membrane mitochondriale et la mort cellulaire

Malgré le rôle central que jouent les mitochondries dans la régulation de l'homéostasie cellulaire, elle intervient aussi dans la mort cellulaire, à savoir l'apoptose ou la nécrose [16]. L'homéostasie cellulaire est perturbée par de nombreuses substances toxiques, ce qui peut entraîner la destruction de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la cellule. Cette toxicité peut être suivie d'une ou plusieurs troubles critiques de la biochimie cellulaire, l'épuisement d'ATP, et surproduction de ROS et/ou l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire [17,18,19,20,21].

La membrane externe des mitochondries est perméable pratiquement de toutes les molécules de taille inférieure à 1,5 kDa. Cette perméabilité non sélective est due essentiellement à la porine mitochondriale ou VDAC. La membrane externe abrite également un canal cationique, le PSC (peptide sensitive channel), associé à la machinerie de translocation des protéines dans la mitochondrie. La membrane interne est beaucoup plus sélective : les échanges à travers cette membrane sont effectués par des transporteurs spécifiques comme par exemple le translateur ADP/ATP [22]. Il est communément admis que la perméabilisation est liée à l'ouverture du PTP (pore transitoire de perméabilité). Celui-ci est composé de l'association momentanée de protéines provenant de divers compartiments mitochondriaux, dont la protéine transmembranaire de la membrane interne ANT, et celle de la membrane externe VDAC [23]. L'augmentation du calcium intracellulaire pourrait conduire à une perte de perméabilité des membranes mitochondriales entraînant, d'une part à un effondrement du potentiel de membrane et des taux d'ATP aboutissant à un phénomène de nécrose et d'autre part, à une libération des facteurs pro-apoptotiques [24,25].

Morphologiquement, l'apoptose provoque les cellules à se rétrécissent et forment des corps apoptotiques, alors que les cellules qui subissent une nécrose sont détruits lors de la rupture de la membrane cellulaire, la membrane plasmique reste le plus souvent intacte, contrairement à l'apoptose, la nécrose ne comporte pas l'ADN et la dégradation des protéines [26]. De nombreux médicaments toxiques provoquent soit l'apoptose ou la nécrose, en fonction de la dose utilisée. L'appauvrissement de l'ATP conduit à la mort cellulaire nécrotique. Les substances toxiques peuvent induire l'apoptose de faibles concentrations ou tôt après l'exposition, alors que la nécrose peut survenir plus tard aux plus hautes concentrations [27].

### 1.2.3. La toxicité mitochondrial par l'hydrazine

Plusieurs études ont rapporté que la toxicité de l'HD 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 et à l'inhibition de succinate déshydrogénase [28]. Le CYP2E1 qui est un des générateurs des ERO est également exprimé au niveau des mitochondries, donc ; il est possible que le rôle de CYP2E1 peut être simplement dans l'augmentation de l'extension du stress oxydant [29]. La génération accrue de ERO au niveau des mitochondries provoque l'épuisement des GSH mitochondrial ; l'épuisement de GSH mitochondrial en dessous d'un seuil critique favorise ainsi l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en altérant sa désintoxication. Cela déclenche le dysfonctionnement mitochondrial, l'activation de c-Jun-N-terminal kinase (JNK), et la mort cellulaire [13].

#### 1.2.3.1. Les mégamitochondrie

Lorsque les cellules sont exposées à divers stimuli mitochondriaux elles peuvent modifier leurs formes pour s'adapter aux nouvelles conditions environnementales, ces changements structuraux des mitochondries peuvent être classés à la base d'un gonflement simple et la formation d' mégamitochondrie (MG). La détection de MG a été signalé à plusieurs reprises dans la littérature dans des échantillons de biopsies ou autopsiés obtenu à partir de patients souffrant d'une variété de maladies et aussi dans les tissus ou les cellules de culture sous diverses conditions expérimentales [30]. Parmi ces maladies celles énumérées dans le foie alcoolique et la myopathie mitochondriale qui sont distincts des autres atteintes d'où la présence des MG a été utilisé comme un outil de diagnostic clinique [31]. Il a été rapporté que l'exposition de l'HD conduit à l'épuisement d'ATP et la formation de mégamitochondria *in vivo* [32]. Plusieurs expérimentations ont décrit la formation des MG au niveau des cultures cellulaires hépatocytaires exposées à (0.5–5 mM ; 22 h) d'HD [27,28].

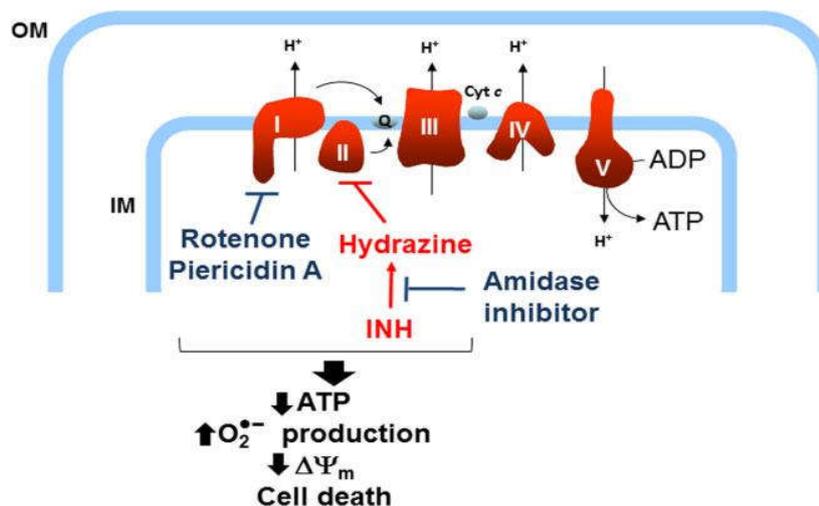


Figure 2.2 : Inhibition du complexe II par l'hydrazine [33].

## 2. Interaction de l'hydrazine avec les microsomes hépatiques

Les enzymes de biotransformation sont habituellement classées en deux familles : les enzymes de phase I (dont les cytochromes P450 sont majoritaires) et les enzymes de phases II (ou transférases) qui interviennent afin de conjuguer le xénobiotique ou son métabolite à des molécules polaires. Les transporteurs membranaires (phase III) jouent également un rôle crucial dans l'élimination des composés hors de la cellule, ces protéines appartiennent à des superfamilles MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) qui véhiculent les anions organiques (glucuronate, sulphate et conjugat au glutathion) à travers la membrane apicale des hépatocytes. Ils permettent l'élimination de substances exogènes vers la bile [34,35].

### 2.1. Les microsomes hépatiques

Les microsomes hépatiques sont des fractions subcellulaires qui portent des enzymes métabolisant y compris le cytochrome P450 (CYP). En plus de la richesse des microsomes hépatiques par les enzymes impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques, elles servent aussi comme un outil dans le système biologique qui évalue la clairance intrinsèque (CLINT) d'un médicament, [36]. La régulation des CYP est essentiellement transcriptionnelle : les récepteurs nucléaires sont reconnus comme des médiateurs clés de la modulation des enzymes du métabolisme des médicaments [35]. Ils ont pour ligands des substances exogènes et endogènes qui peuvent avoir une action agoniste ou antagoniste sur ces facteurs de transcription. La co-administration de médicaments, ligands agonistes ou antagonistes des récepteurs nucléaires, peut conduire à des toxicités sévères. Le

polymorphisme génétique de ces enzymes joue également un rôle non négligeable dans leur activité métabolique et doit être pris en compte lors de l'administration de médicaments. Ainsi, l'activité des CYP étant dépendante du génotype et de l'environnement, elle est depuis peu utilisée en tant que biomarqueur permettant d'évaluer les conséquences d'une exposition à des molécules environnementales ou à la susceptibilité à certaines pathologies [34].

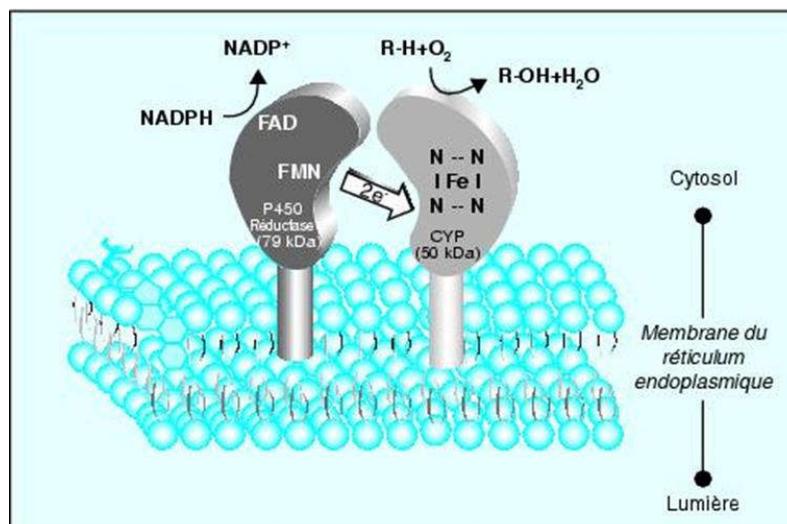


Figure 2.3 : Localisation membranaire de cytochromes P450 dans le réticulum endoplasmique

<https://www.researchgate.net>

### 2.1.1. CYP2E1

Le CYP2E1 est exprimé en grande quantité au niveau de l'hépatocyte, et en quantité de 10 à 100 fois plus faible dans les cellules de Kupffer, et les tissus extra-hépatiques (poumons, œsophage, intestin, cerveau, lymphocytes). La répartition du CYP2E1 dans les hépatocytes n'est pas homogène. Les plus grandes concentrations sont retrouvées dans la région péri-veineuses du lobule hépatique, où l'induction par la toxicité est le plus prononcés [35]. La variabilité interindividuelle des taux de CYP2E1 est grande chez l'homme et résulte probablement des différentes inductions dues à des facteurs environnementaux [36].

La transformation d'un composé chimique par les enzymes à cytochromes P450 se procède lieu sur la face externe du réticulum endoplasmique où l'enzyme s'est ancrée. Le site actif du cytochrome P450 contient un atome de fer (Fe) fixé par des liaisons de coordination [37]. Deux électrons provenant d'une molécule de NADPH sont transférés à l'hémoprotéine par une flavoprotéine (FAD-FMN) en présence d'une molécule organique (R-H) et d'un atome d'oxygène. Le composé organique étant oxydé, un atome d'oxygène moléculaire est incorporé au produit chimique (R-OH). R : médicaments, acides gras, stéroïdes, polluants [38,39].

### 2.1.2. Mécanisme de la toxicité microsomale par l'hydrazine

Les CYP sont capables de générer des métabolites réactifs. Ces métabolites intermédiaires ont une demi-vie souvent très courte et ne sont pas détectables dans le plasma. La réaction *in situ* de ces métabolites réactifs et la localisation principalement hépatique des CYP expliquent leur rôle majeur dans la survenue des hépatites médicamenteuses [40].

### 2.2. Dérivés de l'hydrazine et intermédiaires réactives

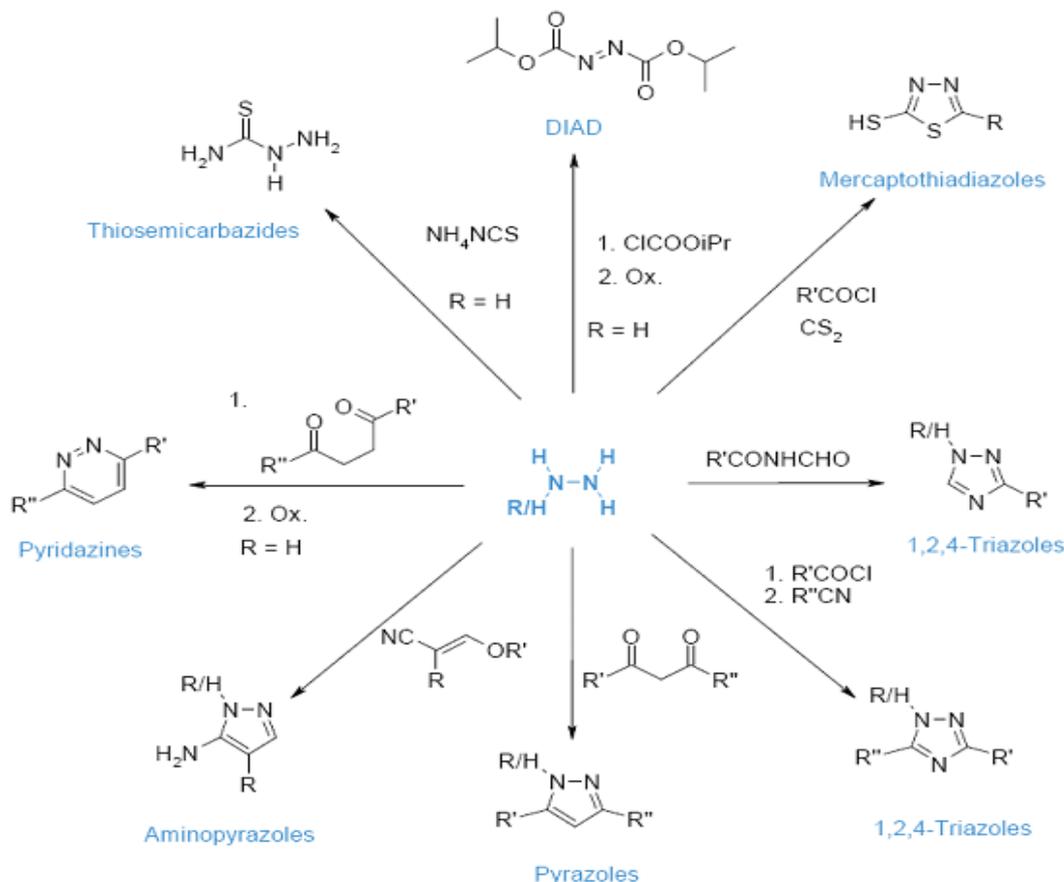


Figure 2.4 : Dérivés de l'hydrazine et réactives intermédiaires [21].

Une des principales voies métaboliques des dérivés de l'hydrazine est celle qui conduit à la formation de diverses espèces de radicaux libres *in vitro* et *in vivo* [21].

### L'hydralazine

L'hydralazine est l'une des hydrazines les plus intéressantes utilisées actuellement en médecine en tant que vasodilatateur et anticancéreux. Il est rapporté que l'hydralazine induit des espèces réactives formées de hydralazine qui se lient d'une manière covalente à la protéine détectés durant le métabolisme microsomal de l'hydralazine [21, 41, 42].

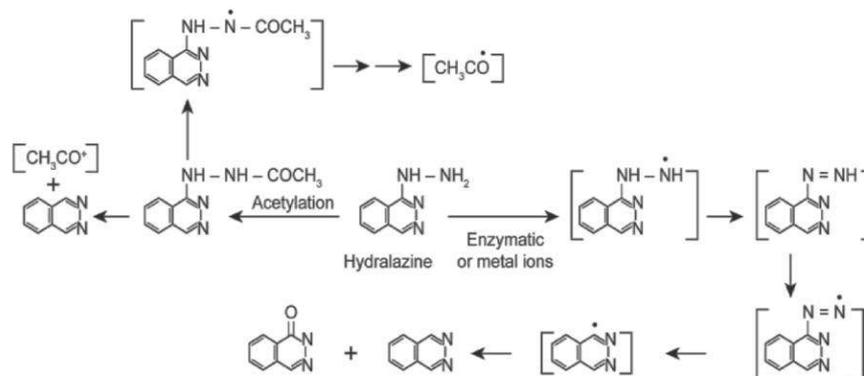


Figure 2.5: Structure de l'hydralazine et la formation de divers métabolites réactifs catalysés par les ions métalliques ou par les enzymes [43].

### L'isoniazid

L'oxydation d'un électron de l'isoniazide conduit à la formation d'un radical isoniazidyle qui se décompose par la suite pour donner à la fois des radicaux pyridyle-CO et pyridyle (figure 2). Ces intermédiaires radicalaires sont réactifs et peuvent facilement alkyler les protéines et/ou initier la peroxydation lipidique. Lorsque l'acétylhydrazine est formée à partir de l'hydrolyse de l'acétylisoniazide, une oxydation d'un électron de l'acétylhydrazine conduit à la genèse du radical acétyle qui s'implique dans la liaison covalente aux macromolécules cellulaires [44,45].

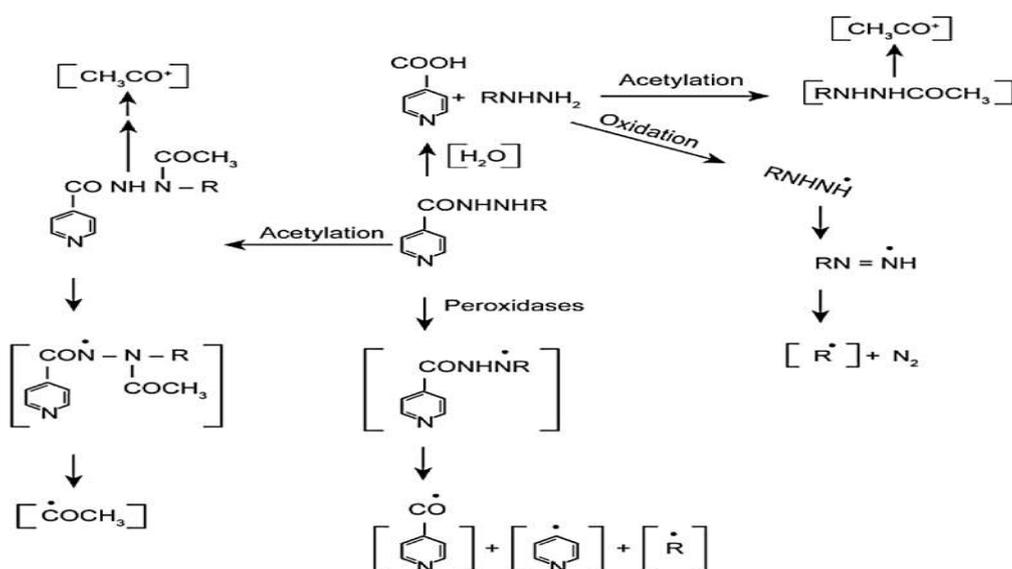


Figure 2.6 : L'activation métabolique d'isoniazid (R=H) et d'iproniazid (R=CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) en diverses espèces réactives [43].



ont clairement montré que ces hydrazines monosubstituées subissent un métabolisme étendu, catalysé par le cytochrome P450, les peroxydases et l'oxyhémoglobine, en espèces radicalaires, ce qui entraîne une liaison covalente avec les protéines et l'ADN [49].

L'hydrazine et ses dérivés se lient d'une manière covalente pour inactiver d'autres composés tels l'hème lactoperoxydase, le raifort peroxydase, la myoglobine et le cytochrome C [50]. Les dérivés oxydés de l'hydrazine, en particulier les diazenes sont sensibles à l'oxygène, et se lient aux composés hème. Les études de Burke *et al.* et Clark *et al.* [51,52] ont indiqués que l'hydrazine est capable d'inhiber la fonction des microsomes hépatiques. Ces observations étaient intrigantes depuis qu'on a trouvé qu'un certain nombre d'hydrazines thérapeutiques, notamment phénelzine, isocarboxazid, isoniazide, iproniazid, et mebanazine, sont capables d'inhiber la N-déméthylation et les réactions de C-hydroxylation du système cytochrome P-450- de monooxygénase dépendant des microsomes hépatiques. Les résultats de Reed *et al* [26]. concernant le métabolisme microsomal du monoalkyl- et methylhydrazines indiquent que les monooxygénases cytochrome P-450-dépendant sont responsables de la N-déméthylation de la methylhydrazines la formant les alcanes à partir alkylhydrazines. Il a été suggéré que la formation des alcanes se produit par l'intermédiaire d'un diazène. Nelson *et al.* [45] ont prouvé le métabolisme microsomal de l'isopropylhydrazine et acetylhydrazine et la liaison covalente résultante de leurs métabolites aux protéines microsomales. Des études antérieures sur le métabolisme de l'hydrazine ont démontré que le 1, L- et le 1,2-disubstitué hydrazines sont métabolisés soit par le contenant FAD- ou le cytochrome P-450 monooxygénase au azoïque dérivé. Basé sur le travail de McBride *et a.l* et Kosower [53,54], il est prévu que les intermédiaires azoïque et diazène serient les principaux produits formés lors de l'oxydation biologique et chimique de l' hydrazines. Des études *in vitro* au niveau des hépatocytes isolés de rat ont indiqué qu'au moins trois isoenzymes CYP2E1, CYP2B1 et CYP1A1 / 2) sont impliqués dans la détoxification de l'hydrazine [55].

D'autres étude ont illustrées que l'hydrazine est également métabolisé par les mitochondries du foie chez les rats et qu'une dose unique de l'hydrazine (3-1 mg.kg i.p.) a provoqué l'accumulation de triglycérides au niveau hépatique et de l'appauvrissement de l'ATP chez le rat après 9 h [56]. L'exposition répétée des rats à l'hydrazine (approximativement égales à 2,5 mg.kg-1 par jour) pendant 10 jours a entraîné l'épuisement hépatique du glutathion réduit (GSH) et des triglycérides. L'exposition répétée à l'hydrazine a également provoqué une induction de l'activité de p-nitrophénol hydroxylase (NPH) ainsi que des changements dans d'autres enzymes microsomales hépatiques. Ceux-ci comprenaient 7-O-

pentoxyrésorufine dééthylase (PROD) et O-de ethylase (EROD), cytochrome P450 totale, l'activité réductase 7-éthoxyrésorufine cytochrome b5 [57].

Plusieurs études expérimentales indiquent que certains CYP contribuent à la production d'espèces réactives de l'oxygène au cours du métabolisme de différents substrats. Il est possible que ces espèces réactives de l'oxygène participent à la pathogénie de certaines maladies [58]. Une étude récente, réalisée avec des modèles animaux, rapporte une diminution de l'atteinte cardiaque observée au cours de l'ischémie perfusion grâce à des inhibiteurs du CYP [59]. En plus de son rôle d'enzyme métabolisant les xénobiotiques, l'expression du CYP2E1 a souvent été associée à certaines conditions pathologiques, incluant les maladies hépatiques d'origine alcoolique ou non alcoolique. En effet, des études récentes ont montré une augmentation de l'expression et de l'activité du CYP2E1 hépatique chez les sujets atteints de stéatohépatites non alcooliques [39,40]. Ces observations laissent supposer que le CYP2E1 pourrait jouer un rôle dans la survenue d'un stress oxydant et dans l'apparition de complications au cours des hépatites. Actuellement études indiquent de plus en plus que les mitochondries hépatiques pourraient constituer une source non négligeable d'espèces réactives de l'oxygène dans les stéatohépatites non alcooliques [60]. Bien que la chaîne respiratoire soit un site majeur de production d'espèces réactives de l'oxygène, des données récentes suggèrent qu'une expression ectopique du CYP2E1 dans la mitochondrie pourrait être à l'origine d'une production importante *in situ* d'espèces réactives de l'oxygène [43]. En effet, il a été montré, *in vitro*, que l'inhibition spécifique du CYP2E1 mitochondrial entraînait une diminution importante de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les mitochondries, indiquant que le CYP2E1 contribue très activement à leur production au sein de la mitochondrie [61].

### 2.3 CYP et stress oxydatif

Les hydrazines transformés en radicaux libres peuvent réagir directement avec les lipides cellulaires et entraîner une peroxydation lipidique des membranes. La fixation covalente observée avec les métabolites électrophiles constitue un deuxième type de lésion moléculaire [62]. Les métabolites réactifs fortement électrophiles réagissent avec les constituants cellulaires fortement nucléophiles comme l'ADN ou les résidus lysine des protéines [59]. Les métabolites faiblement électrophiles réagissent avec les constituants faiblement nucléophiles comme les résidus cystéine des protéines et du glutathion. La conjugaison de ces métabolites au glutathion entraîne une déplétion très importante du

glutathion dépassant les capacités de synthèse de la cellule. La consommation du glutathion associée à la fixation covalente sur les thiols protéiques aboutit à une diminution massive des thiols protéiques. Cette diminution entraîne par la suite une inactivation des calcium translocases de la membrane plasmique [55]. Plusieurs études ont rapporté que certaines dérivées hydrazines génèrent l'oxyde nitrique  $\text{NO}^\circ$  en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  la formation du  $\text{NO}^\circ$  mène à la genèse d'autres espèces réactives telles que le peroxy-nitrite, les radicaux  $\text{NO}_2$  qui induisent le dommage d'ADN et provoquent la nitrosylation des protéines et des enzymes résultant dans les fonctions cellulaires compromises [63, 64, 65, 66, 67].

## Références bibliographiques

- [1] Don Wayne Fawcett. An atlas of fine structure : the cell, its organelles, and inclusions, 1966 ; PP.448, ISBN 0-7216-3584-9.
- [2] Martin Picard, Tanja Taivassalo, Gilles Gouspillou, and Russell T Hepple. Mitochondria: isolation, structure and function. *J Physiol*, 2011 ; 589(Pt 18) : 4413–4421.
- [3] Alexander M. van der Bliek, Qinfang Shen, and Sumihiro Kawajiri. Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013; 5(6): 458-463.
- [4] Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*, 2001; 114(Pt 5):867-74.
- [5] Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl*, 2012; 35(2):109-24.
- [6] Trifunovic A, Larsson NG. Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J Intern Med*, 2008; 263(2):167-78.
- [7] Begriche K, Massart J, Robin MA, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol*, 2011; 54(4):773-94.
- [8] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005; 120:483-495.
- [9] Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*. 2002 ; 80:780-787.
- [10] Seifert EL, Estey C, Xuan JY, Harper ME. Electron transport chain-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission during long-chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem*. 2010; 285:5748-5758.
- [11] 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.
- [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] Martin Picard, Tanja Taivassalo, Darmyn Ritchie, Kathryn J. Wright, Melissa M. Thomas, Caroline Romestaing, and Russell T. Hepple. Mitochondrial Structure and Function Are Disrupted by Standard Isolation Methods. *PLoS One*, 2011 ; 6(3) : 183-197.

- [15] 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.
- [16] Philippe Juin, François-Marie Vallette. Modifications de la perméabilité membranaire mitochondriale au cours de l'apoptose : ouverture ou rupture ?. *médecine/sciences*, 2000 ; 16 : 261-4.
- [17] Nadanaciva S, Bernal A, Aggeler R, Capaldi R, Will Y. Target identification of drug induced mitochondrial toxicity using immunocapture based OXPHOS activity assays. *Toxicol In Vitro*, 2007; 21(5): 902-11.
- [18] Hargreaves IP, Al Shahrani M, Wainwright L, Heales SJ. Drug-Induced Mitochondrial Toxicity. *Drug Saf*, 2016; 39(7):661-74.
- [19] Nadanaciva S, Will Y. Current concepts in drug-induced mitochondrial toxicity. *Curr Protoc Toxicol*, 2009.
- [20] Chan K, Truong D, Shangari N, O'Brien PJ. Drug-induced mitochondrial toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2005; 1(4):655-69.
- [21] De Flora S, Zancacchi P, Bennicelli C, Camoirano, A, Cavanna M, et al. In vivo and in vitro genotoxicity of three antihypertensive hydrazine derivatives (hydralazine, dihydralazine, and endralazine). *Environ Mutagen*, 1982 ; 4: 605-619.
- [22] E.L. Seifert, C. Estey, J.Y. Xuan, M.E. Harper Electron transport chain-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission during long-chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem*, 2010 ; 285 : 5748–5758.
- [23] Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010; 11(9):621-32.
- [24] Der-Fen Suen, Kristi L. Norris, and Richard J. Youle. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev*, 2008; 15; 22(12): 1577–1590.
- [25] Pothana Saikumar, Manjeri A. Venkatachalam. Apoptosis and Cell Death. *Basic Concepts of Molecular Pathology*, 2009; 29-40.
- [26] John C. Reed. Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol*. 2000; 157(5): 1415–1430.
- [27] Karbowski M, Kurono C, Wozniak M et al. Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med*. 1999; 26: 396–409.
- [28] Ghatineh S, Morgan W, Preece NE, Timbrell JA. A biochemical and NMR spectroscopic study of hydrazine in the isolated rat hepatocyte. *Arch. Toxicol*. 1992; 66: 660–8.
- [29] Apostolova N, Gomez-Sucerquia LJ, Gortat A, Blas-Garcia A, Esplugues JV. Compromising mitochondrial function with the antiretroviral drug efavirenz induces cell survival-promoting autophagy. *Hepatology* 2011; 54: 1009–19.

- [30] Anna Wieczorek, Piotr M. Stępień, corresponding author Dorota Zarębska-Michaluk, Wiesław Kryczka, Paweł Pabjan, and Teodora Król. Megamitochondria formation in hepatocytes of patient with chronic hepatitis C – a case report. *Clin Exp Hepatol*. 2017 Sep; 3(3): 169–175.
- [31] Wakabayashi T. Megamitochondria formation - physiology and pathology. *Megamitochondria formation - physiology and pathology*. *J Cell Mol Med*. 2002 ; 6(4) :497-538.
- [32] Kerai MDJ, Timbrell JA. Effect of fructose on the biochemical toxicity of hydrazine in isolated rat hepatocytes. *Toxicol*. 1997 ; 120:221–30.
- [33] Lee KK, Fujimoto K, Zhang C *et al*. Isoniazid-induced cell death is precipitated by underlying mitochondrial complex I dysfunction in mouse hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med*. 2013; 65: 584–94.
- [34] Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M. [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2006; 64(6):535-48.
- [35] Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)-a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1999, 23 : 991-1007.
- [36] Lindros KO, Cai Y, Penttila K. Role of ethanol-inducible cytochrome P-450 IIE1 in carbon tetrachloride-induced damage to centrilobular hepatocytes from ethanol-treated rats. *Hepatology*, 1990, 12 : 1092-1097.
- [37] Shimada T, Mimura M, Inoue K, Nakamura S, Oda H, Ohmori S, Yamazaki H. Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in liver microsomes of various animal species including rats, guinea pigs, dogs, monkeys, and humans. *Arch Toxicol*, 1997; 71(6):401-8.
- [38] Hill JR. *In Vitro Drug Metabolism Using Liver Microsomes*. *Curr Protoc Pharmacol*, 2004.
- [39] Luo YS , Furuya S , Soldatov VY , Kosyk O , Yoo HS , Fukushima H , Lewis L , Iwata Y , Rusyn I . Métabolisme et toxicité du trichloroéthylène et du tétrachloroéthylène chez des souris transgéniques humanisées et inactivées par le cytochrome P450 2E1. *Toxicol Sci*. 2018. doi : 10.1093.
- [40] Hedges L, Brown S, MacLeod AK, Vardy A, Doyle E, Song G, Moreau M, Yoon M, Osimitz TG, Lake BG. Metabolism of deltamethrin and cis- and trans-permethrin by human expressed cytochrome P450 and carboxylesterase enzymes. *Xenobiotica*. 2018 ; 4:1-7.

- [41] Parodi S, De Flora S, Cavanna M, Pino A, Robbiano L, et al. DNA damaging activity in vivo and bacterial mutagenicity of sixteen hydrazine derivatives as related quantitatively to their carcinogenicity. *Cancer Res*, 1981 ; 41: 1469-1482.
- [42] Streeter AJ, Timbrell JA. Studies on the in vivo metabolism of hydralazine in the rat. *Drug Metab Dispos*, 1983; 11: 184-189.
- [43] Sinha BK. Enzymatic activation of hydrazine derivatives. A spintrapping study. *J Biol Chem*, 1983; 258: 796-801
- [44] Mitchell JR, Zimmerman HJ, Ishak KG, Thorgeirsson UP, Timbrell JA, et al. Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. *Ann Intern Med*, 1976; 84: 181-192.
- [45] Nelson SD, Mitchell JR, Timbrell JA, Snodgrass WR, Corcoran GB 3rd Isoniazid and iproniazid: activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. *Science*, 1976; 193: 901-903.
- [46] Devita VT Jr, Serpick AA, Carbone PP Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *Ann Intern Med*, 1970; 73: 881-895.
- [47] Spivack SD. Drugs 5 years later: procarbazine. *Ann Intern Med*, 1974; 81: 795-800.
- [48] Kelly RB, Daniels EG, Hinmann JW. Agaritine: isolation, degradation, and synthesis. *J Org Chem*. 1962; 27: 3229-3231.
- [49] Lawson T, Gannet, PM, Yau W-M, Dalal NS, Toth B. Different patterns of mutagenicity of arenediazonium ions in V79 cells and *Salmonella typhimurium* TA102: evidence for different mechanisms of action. *J Agric Food Chem*. 1995; 43: 2627-2635.
- [50] Shoeb HA, Bowman BU Jr, Ottolenghi AC, Merola AJ. Peroxidase-mediated oxidation of isoniazid. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985 ; 27(3) :399-403.
- [51] Clark TD, Tram KH, Mwangwa F, Atukunda M, Owaraganise A, Ayieko J, Plenty A, Kwariisima D, Petersen ML, Charlebois ED, Kanya MR, Chamie G, Havlir DV, Marquez C; SEARCH Collaboration. Isoniazid Preventive Therapy Completion in the Era of Differentiated HIV Care. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017 ; 76(5):115-117.
- [52] Burke AA, Severson ES, Mool S, Solares Bucaro MJ, Greenaway FT, Jakobsche CE. Comparing hydrazine-derived reactive groups as inhibitors of quinone-dependent amine oxidases. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017 ; 32(1) :496-503.
- [53] McBride WJ, Hingtgen JN, Aprison MH. Neurochemical correlates of behavior: levels of amino acids in four areas of the brain of the rat during drug-induced behavioral excitation. *Pharmacol Biochem Behav*. 1976 ; 4(1) :53-7.

- [54] Kosower NS, Vanderhoff GA, Jaffe ER, LONDON IM. Metabolic changes in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes induced by acetylphenylhydrazine. *J Clin Invest.* 1963 ; 42:1025-30.
- [55] Delaney J, Timbrell JA. Role of cytochrome P450 in hydrazine toxicity in isolated hepatocytes in vitro. *Xenobiotica.* 1995 ; 25(12) :1399-410.
- [56] Jenner AM, Timbrell JA. In vitro microsomal metabolism of hydrazine. *Xenobiotica.* 1995 ; 25(6) :599-609.
- [57] Jenner AM, Effect of acute and repeated exposure to low doses of hydrazine on hepatic microsomal enzymes and biochemical parameters in vivo. *Arch Toxicol.* 1994;68(4):240-5.
- [58] Moloney SJ, Snider BJ, Prough RA. The interactions of hydrazine derivatives with rat hepatic cytochrome P-450. *Xenobiotica.* 1984; 14: 803-814.
- [59] Granville DJ, Tashakkor B, Takeuchi C, Gustafsson AB, Huang C, Sayen MR, Wentworth P Jr, Yeager M, Gottlieb RA. Reduction of ischemia and reperfusion-induced myocardial damage by cytochrome P450 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 ; 101(5) :1321-6.
- [60] Robin MA, Anandatheerthavarada HK, Fang JK, Cudic M, Otvos L, Avadhani NG. Mitochondrial targeted cytochrome P450 2E1 (P450 MT5) contains an intact N terminus and requires mitochondrial specific electron transfer proteins for activity. *J Biol Chem.* 2001 ; 276(27) :24680-9.
- [61] Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends PharmacolSci.* 2004 ; 25: 193-200.
- [62] Nebert DW. Inter-individual susceptibility to environmental toxicants--a current assessment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 ; 207(2 Suppl) :34-42.
- [63] Tomasi A, Albano E, Botti B, Vannini V. Detection of free radical intermediates in the oxidative metabolism of carcinogenic hydrazine derivatives. *Toxicol Pathol.* 1987; 15: 178-183.
- [64] Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med,* 2009 ; 46(9) :1283-97.
- [65] Brookes PS. Mitochondrial H (+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic Biol Med,* 2005 ; 38(1) :12-23.
- [66] Michael P. Murphy. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J,* 2009 ; 417(Pt 1) : 1–13.
- [67] Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med,* 2000 ; 29(3-4) :222-30.

## Chapitre 3

### Plantes médicinales et hépatoprotection

#### 1. Plantes médicinales et hépatoprotection

Malgré l'énorme progrès scientifique dans le domaine de l'hépatologie, les problèmes de foie restent en augmentation. Plusieurs plantes médicinales endémiques disponibles servent aux traitements des troubles du foie, la plupart d'entre elles ne sont pas encore homologuées. [1]. Les constituants chimiques actifs des plantes protectrices du foie comprennent les phénols, les coumarines, les monoterpènes, les glycosides, les alcaloïdes et les xanthènes [2]. Les flavonoïdes en tant que composés phénoliques largement distribués dans les plantes, exercent de multiples effets biologiques tels les capacités antioxydantes et piégeage des radicaux libres [3]. Dans les lieux où il existe un manque de médecine moderne traitant les troubles du foie, un grand nombre de préparations médicinales sont recommandées pour le traitement des troubles hépatiques [4] et très souvent prétendent offrir un soulagement significatif.

Un certain nombre de plantes et de formulations traditionnelles sont disponibles pour le traitement du foie [5]. Environ de six cents (600) formulations à base d'herbes ayant une activité hépatoprotective revendiquée sont vendues partout dans le monde.

Il existe environ de cinquante-cinq (55) familles de plantes qui ont été signalés comme hépatoprotectrices [6]. En Inde, plus de 93 plantes médicinales sont utilisées dans des différentes combinaisons pour la préparation de quarante (40) formulations à base de plantes brevetées. Toutefois, seule une faible proportion de plantes hépatoprotectrices ainsi que des formulations utilisées dans les médicaments sont évalués pharmacologiquement pour leur innocuité et leur efficacité [7].

Plusieurs études sont établit afin d'évaluer les plantes hépatoprotectrices. Par exemple, la décoction des feuilles de *Byrsocarpus coccineus* (Connaraceae) consommé pour le traitement traditionnel de la jaunisse en Afrique de l'Ouest s'est révélée qu'elle peut être hépatoprotectrice contre l'hépatotoxicité induite par le CCl<sub>4</sub> chez le rat [8]. L'évaluation de l'activité hépatoprotectrice *in vivo* de l'extrait aqueux d'*Artemisia Absinthium* L. Utilisé pour le traitement des troubles hépatiques dans l'ouïgour traditionnel (en

Chine occidentale) a été expérimentée chez des souris expérimentales contre des Lésion hépatique (par injection d'endotoxine-LPS) [9].

L'exemple de la pulpe de fruit d'*Adansonia digitata*, communément appelée baobab, L'activité hépatoprotectrice et la consommation du fruit peuvent jouer un rôle dans la résistance humaine aux dommages au foie. Le mécanisme de protection du foie peut être dû à la présence de triterpénoïdes, de  $\beta$ -sitostérol, de palmitate de  $\beta$ -amyrine et d'acide ursolique dans la pulpe de fruits [10]. Parmi les nombreux agents hépatoprotecteurs végétaux, la silymarine qui est un extrait végétal standardisé obtenu à partir des graines de chardon-Marie (*Silybum marianum*). La silymarine est un mélange de flavanoïdes complexes, c'est la composante active de la chardon-Marie qui protège les cellules du foie et des reins contre les effets toxiques des médicaments, y compris la chimiothérapie [11]. Il est composé d'un mélange de quatre flavonolignanes isomères: silibinine, isosilibinine, silydianine et la silychristine. Il contient environ 60 % de polyphénol silibine et est utilisé comme un hépatoprotecteur [12]. La silymarine est largement utilisée pour la protection contre divers maladies en Europe et dans le monde. En plus de ses propriétés de piégeage des radicaux libres, la silymarine augmente les enzymes antioxydantes, tels que le superoxyde dismutase (SOD) et la catalase, et inhibe la peroxydation lipidique [13]. Il est rapporté qu'elle offre une protection contre diverses hépatotoxines chimiques telles que  $CCl_4$  et l'alcool [14]. Des études *in vivo* ont démontré que la silymarine exerce un effet protecteur sur les hépatocytes exposés à une gamme de molécules, y compris le tert-butyle, l'hydroperoxyde, la phénylhydrazine, le paracétamol et le tétrachlorure de carbone [15]. Il a été trouvé que le traitement par la silymarine entraîne une diminution des taux de transaminases dans quatre études comparatives chez les patients atteints d'hépatite virale chronique. En raison de son hépatoprotéctivité prouvée, la silymarine est utilisée comme l'un des agents standard pour la comparaison et l'évaluation des effets hépatoprotecteurs [13].

## 2. Aperçu bibliographique sur les espèces du genre *Heliotropium* (Boraginaceae)

### 2.1. Présentation de la famille Boraginaceae

C'est une famille de plantes dicotylédones. Les espèces de cette famille sont des herbes vivaces, bisannuelles ou annuelles. Généralement les arbres ou les arbustes de cette famille sont hérissés ou scabreux à feuilles simples, alternes, et rarement opposées, dentelées à la marge ou entièrement. Les inflorescences sont souvent cymes scorpioïdes, rarement

solitaires ; avec présence ou absence des bractées. Les fleurs sont bisexuées, actinomorphes, et rarement zygomorphes [16].

### 2.2. Présentation du genre *Heliotropium*

L'*Heliotropium* est un genre presque omniprésent, englobe environ de 280 espèces les plus connues dans les régions tropicales et les régions tempérées chaudes, avec une plus grande concentration des espèces dans les régions tropicales sèches. Dans le genre *Heliotropium*, le collenchyme sous-épidermique est absent, avec une présence d'un tissu palissadique très régulier dans l'écorce de la tige. Le péricycle de cette dernière comprend un certain nombre de fibres qui est totalement absent dans le pétiole [17].

#### 2.3.4. Habitats et distribution

Les espèces de la famille Boraginaceae sont largement distribuées dans le monde entier. Elle couvre l'ensemble de l'Amérique du Nord, l'Europe, l'Asie, l'Australie, l'Afrique du Nord, et l'Est d'Afrique. Les genres de cette famille se développent principalement dans des habitats secs, ensoleillés et les endroits escarpés [18].



Figure 3.1 : Répartition géographique des Boraginaceae dans le monde

[fr.wikipedia.org/wiki/Boraginaceae](http://fr.wikipedia.org/wiki/Boraginaceae)

#### 2.3.5. Utilisation et intérêt des espèces du genre *Heliotropium*

Les différents genres de la famille Boraginaceae sont d'importance économique moins considérable ; seules quelques espèces sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des plaies, de la fièvre, des douleurs thoraciques et les maladies de la peau [19].

Certaines espèces sont cultivées comme plantes ornementales, sources de producteurs de bois ou de colorants. La famille est généralement considérée comme étroitement liée au Hydrophyllaceae, et les Lamiacées [18].

### 5. Les métabolites secondaires les plus courants du genre *Heliotropium*

Les espèces du genre *Heliotropium* ont été largement étudiées du point de vue structural. Plusieurs travaux ont montré la présence de diverses classes chimiques telles que les terpenoïdes, les composés phénoliques dont les flavonoïdes et en particulier les alcaloïdes de type pyrrolizidines [20, 21, 22, 23].

#### 5.1.1. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs)

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs) comprennent un hétérocycle pyrrolizidine, avec un groupe méthyle et un substituant hydroxyle (nécine) [24] et dont le squelette est reporté dans la figure 4. La substance est toxique si elle présente une insaturation entre les positions 1 et 2 de l'hétérocycle et une estérification spécifique du groupe hydroxyle attaché à la nécine. Compte tenu de toutes les combinaisons chimiques possibles de ces structures, il pourrait y avoir plus de 600 molécules différentes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, et jusqu'à présent plus de 350 ont été identifiées [25].

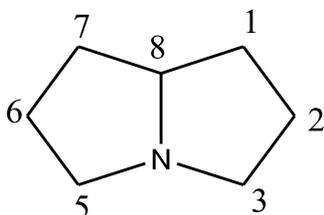


Figure 3.2 : Structure de base des alcaloïdes pyrrolizidiniques [26].

Le (tableau 3.1) regroupe quelques exemples d'alcaloïdes pyrrolizidines isolés des espèces du genre *Heliotropium*

Tableau 3.1 : Liste des alcaloïdes pyrrolizidiniques des quelques espèces du genre *Heliotropium* [27, 28, 29, 30, 31, 32]

L'espèce	Alcaloïdes Pyrrolizidiniques (PAs)
<i>H. indicum</i> L.	Echinatine, helindicine, heliotrine, heleurine, indicine, acetylindicine, indicinine, lasiocarpine, lycopsamine, rinderine, supinine, lindelofidine, retronecine, supinidine, trachelanthamine
<i>H. Ovalifolium</i> Forssk	Heliofoline, retronecine
<i>H. Bacciferum</i> Forssk	Europine, heliotrine, heleurine, supinine
<i>H. Angiospermum</i>	Subulacine, lindelofidine, retronecine, supinidine, trachelanthamidine
<i>H. curassavicum</i> L	Coromandaline, coromandalinine, curassavine, curassavinine, curassanecine, heliocurassavine, heliocurassavinine, supinidine, heliocurassavicine, heliocoromandaline, heliovicine, retronecine, 7-angeloylheliotridine, trachelanhamidine
<i>H. arbainense</i> Fres	Europine, heliotrine, lasiocarpine
<i>H. arborescens</i> L	Indicine, 3'-acetylindicine, lasiocarpine
<i>H. crassifolium</i> Phil	Ilamine, europine
<i>H. europæum</i> L.	Europine, acyleuropine, heleurine, heliotrine, 7 angeloylheliotrine, lasiocarpine, 6-acetylasiocarpine, heliotrine N-oxide, supinine, dehydroheliotrine, 5' acetylasiocarpine N oxide, N-(dihydropyrrolizinomethyl)- heliotrine,
<i>H. strigosum</i> Willd	Strigosine, trachelanthamidine
<i>H. bovei</i> Boiss.	Europine, 7-acyleuropine, lasiocarpine, 5'-acetylasiocarpine, lasiocarpine N-oxide, 5'- acetylasiocarpine N-oxide
<i>H. bracteatum</i> R	Helibractinecine, retronecine, helibracteatinine, helibracteatine
<i>H. bursiferum</i> C.	7-Angeloylretronecine
<i>H. digynum</i> Forssk	Europine, heliotrine, 7-angeloylheliotrine, lasiocarpine

## 5. 2. Les terpénoïdes

Les terpènes sont les produits naturels les plus nombreux et les plus structurants. L'unité de base des squelettes terpéniques est l'unité d'isoprène, molécule de cinq-carbone (figure 3.3) [33]. Une unité d'isoprène liée avec un second isoprène est la caractéristique définissant le terpène, qui est également un monoterpène (C10). Alors que les sesquiterpènes contiennent trois motifs isoprène (C15), les diterpènes (C20) et les triterpènes (C30) contiennent deux et trois unités terpènes, respectivement [34]. Les tétraterpènes sont constitués de quatre motifs terpènes et les polyterpènes sont les terpènes contenant plus de quatre unités terpéniques (c'est-à-dire plus de huit motifs isoprène) [35].

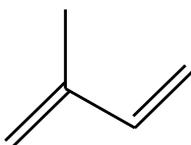


Figure 3.3 : structure de l'unité isoprène.  
<https://fr.wikipedia.org/wiki/Isoprène>

Le tableau 3.2 renferme quelques exemples de terpènes identifiés dans les espèces du genre *Heliotropium*.

Tableau 3.2 : Liste des terpénoïdes identifiées d'espèces du genre *Heliotropium*.

Les espèces	Les terpénoïdes	Ref.
<i>H. ellipticum</i>	$\beta$ -sitosterol, stigmasterol, $\beta$ -amyrin, friedelan- $\beta$ -ol, cycloartenone, $\beta$ -amyrinacetate, friedelin	[36]
<i>H.marifolium</i>	$\beta$ -sitosterol, stigmasterol, $\beta$ -amyrin, friedelan- $\beta$ -ol, cycloartenone, $\beta$ -amyrinacetate, friedelin, epifriedenylacetate	[23]

## 5.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 de composés naturels [37], ce sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles responsable de la coloration jaune orange et rouge de différents organes végétaux [37,38]. Les flavonoïdes comprennent 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, ce dernier étant le plus souvent engagé dans un hétérocycle avec un atome d'oxygène [39]. L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone-synthase, de trois molécules de malonyl-CoA avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydroxycinnamique [38]. Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone et

peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- $\gamma$ -pyrone [37]. les flavonoïdes se polymérisent au départ de 3,4-flavanediols(ou flavan-4-ols) et de flavan-3-ols [40].

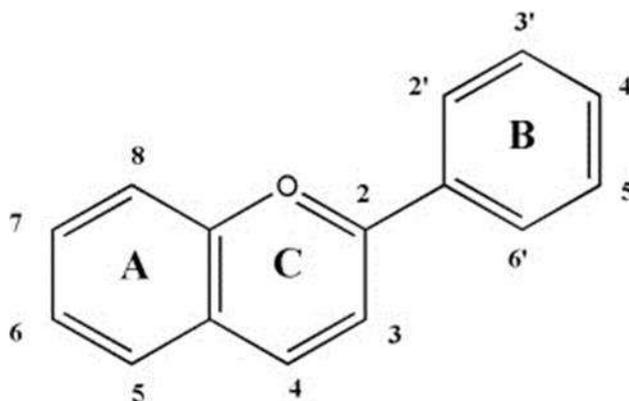


Figure 3.4 : Structures de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone [40].

L'une des caractéristiques des espèces *Heliotropium* est la diversité de leur métabolisme flavonique. On y rencontre des flavanones, flavanols et flavonols et quelques flavones cités dans la littérature. Le (tableau 3.3) rassemble quelques exemples de flavonoïdes isolés et identifiés d'espèces du genre *Heliotropium*

Tableau 3.3 : Liste des flavonoïdes identifiés d'espèces du genre *Heliotropium*

Les espèces	Flavonoïdes (Géranyl aromatiques)	Ref.
<i>H. glutinosum</i>	4-methoxy-3-[(2)-7'-methyl-3'-hydroxymethyl-2',6'-octadienyl] phenol, 5,3'-dihydroxy-7,4' dimethoxyflavanone, 5,4'-dihydroxy-7 methoxyflavanone, 4'-acetyl-5- hydroxy -7-methoxyflavanone	[27]
<i>H. taltalense</i>	Filifolinol, filifolinylsenecionate, naringenin, 3-O-methylgalangin, 7-O-methyletheriodictiol	[41]
<i>H. sclerocarpum</i>	Filifolinol, naringenin, 3-oxo-2- arylbenzofurane	[42]
<i>H. filifolium</i>	Filifolinol, filifolinylsenecionate, filifolinone, acide filifolinoiqueFilifolinone,	[43]
<i>H. strigosum</i>	Taxifoline (Dihydroquercetine), quercetine	[44]

## 6. Propriétés thérapeutiques et biologiques des espèces du genre *Heliotropium*

### 6.1. Activité anti-oxydante et anti-inflammatoire

L'espèce *Heliotropium taltalense* est une espèce spécifique par sa production d'exsudats résineux qui couvre sa surface. Après analyse chimique de ces composés, deux dérivés de géranyl aromatiques : filifolinol et filifolinyl sénécionate, ainsi que trois flavonoïdes (naringenin, 3-Ométhylgalangin et 7-O-méthylériodictiol) ont été isolés. L'activité antioxydante de cette plante et son exsudat résineux ont été prouvés par la méthode de DPPH [41].

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait brut de *H. strigosum* a été évaluée par l'utilisation des modèles animaux avec induction d'œdème par la carragénine et par du xylène à 50, 100 et 200 mg/kg par voie intra-péritonéale. Les résultats ont révélé une atténuation marquée de l'œdème induit par l'injection de carragénine et de xylène de manière dose-dépendante. L'étude a indiqué que divers extraits de l'espèce *H. Strigosum* possédaient une forte activité anti-inflammatoire dans des modèles animaux [44].

En outre, l'effet anti-inflammatoire des feuilles de l'*H. indicum* était remarquable chez des modèles animaux possédant des signes significatifs d'œdème de la patte arrière induite par la carragénine et d'autres modèles d'inflammation tels que le granulome [30].

L'effet anti-inflammatoire de *H. ovalifolium* a été identifié par sa capacité d'inhiber des cytokines spécifiques d'inflammation, l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale - alpha (TNF- $\alpha$ ) dans les cellules THP-1 [31].

## 7. La synergie des espèces du genre *Heliotropium*

La synergie des plantes est le terme le plus approprié pour distinguer la phytothérapie de la médecine conventionnelle. Dans cette optique plusieurs chercheurs ont révélé que plusieurs plantes donnent lieu à des usages inattendus grâce à la combinaison naturelle de leurs principes actifs [45]. Cela est expliqué par la synergie des diverses substances des plantes. Donc un ou même plusieurs principes actifs isolés ne permettent pas d'obtenir le même résultat de la plante entière. Modak et al. ont évalué l'effet synergique de la résine de l'*H. Sclerocarpum* par la méthode de DPPH. Les valeurs obtenues de l'extrait sont supérieures à celles obtenues pour les composés purs. Cela indique que la résine offre une protection instantanée à la plante et aussi sur le long terme. Ainsi que ces résultats confirment la présence d'une certaine forme de synergie de ses composants [42].

### 8. Toxicité des espèces du genre *Heliotropium*

Il a été rapporté par Farrag et al que la plante *Heliotropium bacciferum* porte des effets cytotoxiques dus à la présence des alcaloïdes pyrrolizidines comprenant l'héliotrine, Heleurine, Supinine, Europine [32]. Bick et al ont rapporté que l'héliotrine est classée comme un agent alkylant et peut causer des mutations et des lésions hépatiques par sa réaction avec le groupe phosphate de l'ADN pour former un phosphate de trialkyle entraînant la dégradation de l'ADN en petits fragments. En effet, les alcaloïdes pyrrolizidines provoquent des lésions chromosomiques chez les bactéries, les champignons et les cultures cellulaires [46].

Alanazi et al. ont étudié les effets toxiques possibles de l'extrait aqueux de *H. bacciferum* sur le système reproducteur chez le rat. L'examen histologique des testicules a révélé quelques changements qui ont été détectés dans la queue épидидymaire, dont le plus important était le développement de granulomes [47].

Une autre étude réalisée par Yusufoglu et al. sur l'effet des extraits d'éthanol d'*Heliotropium europaeum* sur la reproduction et la fertilité chez les rats mâles. Les résultats ont montré que l'extrait d'éthanol de *Heliotropium europaeum* possède des effets d'abaissement de la fertilité potentiels sans altération du métabolisme général du corps [48].

Bourauel et al. ont isolé deux types d'alcaloïdes pyrrolizidiniques de *Heliotropium arborescens* (indicine, 12-O-acétylindicine). Les rapporteurs ont indiqué que les alcaloïdes isolés à partir de cette espèce portent une toxicité importante [49].

## Références bibliographiques

- [1] Jamal A K, Yaacob WA, Laily BD. A chemical study on *Phyllanthus columnaris*  
Eur. J. Sci. Res, 2009 ; 28(1) :76–81
- [2] Bhawna S., Kumar S.U. Hepatoprotective activity of some indigenous plants. *Int. J. PharmTech Res*, 2009 ; 4:1330–1334.
- [3] Hepatoprotective activity of extracts from stem of *Mussaenda erythrophylla* lam. against carbon tetrachloride-induced toxicity in rats. *Korean J. Pharmacogn*, 1996 ; 27: 113
- [4] Chatterjee TK. Medicinal plants with hepatoprotective properties. In : *Herbal Options*. 3rd Edn. Books and Allied (P) Ltd. Calcutta, 2000 ; 135.
- [5] M.K. Rai. Herbal medicines in India ; retrospect and prospect *Fitoterapia*, 1994 ; 65(6) : 483-491.
- [6] Girish C, Pradhan SC. Indian herbal medicines in the treatment of liver diseases: problems and promises. *Fundam Clin Pharmacol*, 2012 ; 26(2) :180-189.
- [7] S. Subramaniam, H.B.H. Khan, N. Elumalai, S.Y.S. Lakshmi. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of whole plant of *Andrographis paniculata* against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. *Comp Clin Path*, 2015 ; 24 : 1–7.
- [8] Akindele AJ, Ezenwanebe KO, Anunobi CC, Adeyemi OO. Hepatoprotective and in vivo antioxidant effects of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae). *J Ethnopharmacol*, 2010 ; 129(1) :46-52.
- [9] Amat N, Upur H, Blazeković B. In vivo hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice. *J Ethnopharmacol*. 2010 ; 131(2) :478-84.
- [10] E. A. Adewusi and A. J. Afolayan. Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of the roots and leaves of *Pelargonium reniforme* Curtis (Geraniaceae). *African Journal of Biotechnology*, 2009 ; 8 (22) : 6425-6433.
- [11] Post-White J, Ladas EJ, Kelly KM. Advances in the use of milk thistle (*Silybum marianum*). *Integr Cancer Ther*, 2007 ; 6(2) :104-109.

- [12] Boigk G, Stroedter L, Herbst H, Waldschmidt J, Riecken EO, Schuppan D. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology*. 1997 ; 26(3) :643-649.
- [13] Sánchez-Sampedro A, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R, Corchete P. Metabolomic alterations in elicitor treated *Silybum marianum* suspension cultures monitored by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biotechnol*. 2007 ; 130(2) :133-142.
- [14] Crocenzi FA, Roma MG. Silymarin as a new hepatoprotective agent in experimental cholestasis: new possibilities for an ancient medication. *Curr Med Chem*, 2006 ; 13(9) :1055-74.
- [15] Dixit N, Baboota S, Kohli K, Ahmad S, Javed Ali. Silymarin : A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches, 2007 ; 39(4) : 172-179.
- [16] Zhu Ge-ling, Harald Riedl, Rudolf Kamelin. *Boraginaceae*. Flora of China, 1995; 16: 329–427.
- [17] Miller S. A new species of *Heliotropium* L. (Boraginaceae) from Madagascar. *Adansoni* . 2003; 25 (1): 115-118.
- [18] El-Gazzara A , El-Ghamery A, El-Saied A, Khattab A H, El-Kady A A. Computer-generated keys to the flora of Egypt. 6. The Boraginaceae. *Annals of Agricultural Sciences*, 2015 ; 60(1): 67-85.
- [19] El Naggar S, El-Hadidy A and Olwey A. Taxonomic revision of the genus *Heliotropium* (Boraginaceae s.l.) in south Yemen. *Nordic Journal of Botany*. 2015 ; 33(4) : 401-413.
- [20] Oluwatoyin S M, Ndukwe GI, Amupitan J. Phytochemical and antimicrobial studies on the aerial parts of *Heliotropium indicum* Linn. *Annals of Biological Research*, 2011; 2(2): 129136.
- [21] Alain G, Jean-Robert I, Emerson F Q, Chris M F, Kurt H. Quinones from *Heliotropium ovalifolium*. *Phytochemistry*, 2001; 58(4): 631-635.
- [22] Eduardo A, Modaka B, Torresa R, Escobara J, Alejandro U. Total antioxidant potential of resinous exudates from *Heliotropium* species, and a comparison of the ABTS and DPPH methods. *Free Radical Research*, 1999; 30(6): 471-477.

- [23] Singh B, Dubey MM. Estimation of triterpenoids from *Heliotropiummarifolium*Koen ex Retz. in vivo and in vitro. I. Antimicrobial screening. *PhytotherRes*, 2001; 15(3): 231-234.
- [24] Mamta S, Jyoti S, Rajeev N, Dharmendra Singh and Abhishek Gupta. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2013; 1(6): 168.
- [25] Lanzelotti P.L, Grasso D, Gonzalez M. Lesalcaloides de miels. *Abeilles*, 2011 ;(6)145.
- [26] Roeder E T. Analysis of pyrrolizidine alkaloids. *Curr. Org. Chem*, 1999; 3(2): 557-576.
- [27] Naveen G, Sharma K. Bioactive phytoconstituents and plant extracts from genus *Heliotropium*. *International Journal of Green Pharmacy*, 2014; 8(4): 247-667.
- [28] Girijananda C. Pharmacological Activities of Indian Heliotrope (*Heliotropium Indicum* L) .*Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2015; 4(3): 101-104.
- [29] Begum Y. Antibacterial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Heliotropium indicum*. *The Experiment International Journal of Science and Technology*, 2014; 23(1): 1564-1569.
- [30] Dash G K, and Murthy P N. Studies on Wound Healing Activity of *Heliotropium indicum* Linn. *Leaves on Rats*. *ISRN Pharmacol*, 2011; pp8.
- [31] Kulkarni-Almeida A, Suthar A, Goswami H, Vishwakarma R, Chauhan VS, Balakrishnan A, Sharma S. Novel leads from *Heliotropium ovalifolium*, 4,7,8-trimethoxy-naphthalene-2-carboxylic acid and 6-hydroxy-5,7-dimethoxy-naphthalene-2-carbaldehyde show specific IL-6 inhibitory activity in THP-1 cells and primary human monocytes. *Phytomedicine*. , 2008; 15(12):1079-1086.
- [32] Farrag NM, Abdel-Aziz EM , El-Shafae AM, Ateya and El Domiaty MM. Pyrrolizidine alkaloids of *heliotropium bacciferum* forssk from egypt. *International Journal of Pharmacognosy*, 1996; 34(5): 374-377.
- [33] Zwenger S and Chhandak B. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2008; 3(1): 1-7.
- [34] Chappell J. *The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism*. *Plant Physiology*, 1995 ; 107(1): 1-6.
- [35] Bohlmann J, Keeling CI. Terpenoid biomaterials. *Plant J*, 2008 ; 54(4) :656-669.

- [36] Jain SC, Singh B, Jain R. Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. *Fitoterapia*, 2001; 72(6):666-668.
- [37] Ghedira K. Flavonoides: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 2005 ;3(4):162-169.
- [38] Bruneton J. *Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales* 4<sup>ème</sup> édition Lavoisier Jean Bruneton. Life Sciences, 1999; 65(4): 337-353.
- [39] J.-C. Stoclet, V. Schini-Kerth. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. Dietary flavonoids and human health, 2011; 69(2): 78-90.
- [40] Collin S et Crouzet J. *Polyphénols et procédés*. Lavoisier, 2011 (5) : 598.
- [41] Modak B, Rojas M, Torres R. Chemical analysis of the resinous exudate isolated from *Heliotropium taltense* and evaluation of the antioxidant activity of the phenolic components and the resin in homogeneous and heterogeneous systems. *Molecules*, 2009; 14(6):1980-1989.
- [42] Modak B, Salina M, Rodilla J and Torres R. *Molecules*. Isolated from *Heliotropium sclerocarpum* and Evaluation of the Antioxidant Properties of the Phenolic Compounds and the Resin. Study of the Chemical Composition of the Resinous Exudate, 2009; 14: 4625-4633.
- [43] Urzúa A, Echeverría J, Rezende MC, Wilkens M. Antibacterial properties of 3 H-spiro[1-benzofuran-2,1'-cyclohexane] derivatives from *Heliotropium filifolium*. *Molecules*, 2008; 13(10):2385-2393.
- [44] Khan H, Khan MA, Gul F, Hussain S, Ashraf N. Anti-inflammatory activity of *Heliotropium strigosum* in animal models. *Toxicol Ind Health*, 2015 ;31(12):1281-1287.
- [45] Paul Iserin, Michel Masson. *Encyclopedia of Medicinal Plants* (2nd Edition). Dorling Kindersley Limited, Londres, 2001; 2(3):52-14.
- [46] Bick Y E, Culvenor C C. Effects of dehydroheliotridine, a metabolite of pyrrolizidine alkaloids on chromosome structure and cell division in cultures of animal cells. *Cytobios*, 1971; 3: 245–255.

[47] Alanazi K, Alahmadi BA, Alhimaidei A, AbouTarboush FM, Abul Farah M, Mahmoud A and Alfaifi M. Development of spermatocytic granuloma in albino rats following administration of water extract of *Heliotropium bacciferum* Forssk. *Saudi J BiolSci*, 2016; 23(1): 87–91.

[48] Yusufoglu H, Soliman GA, Abdel-Rahman RF, Al Qasumi SI, Anul SA, Akaydin G and Tatli II. Evaluating the antifertility potential of the ethanolic extracts of *Heliotropium europaeum* and *Taraxacum serotinum* in male rats. *J Pharm Sci*, 2013; 38(1): 11-23.

[49] Bourauel T, Kersten R, Röder E. Pyrrolizidin-Alkaloide aus *Heliotropium*. *Scientia Pharmaceutica*, 1995; 63:127- 133.

Deuxième Partie  
PROCOLES EXPERIMENTAUX

# Chapitre 4

## Matériels et méthodes

### 1. Etude chimique de l'espèce *Heliotropium undulatum*

#### 1.1 Présentation de l'espèce

##### 1.1.1. Choix de la plante

Dans cette étude, le choix de l'espèce *Heliotropium undulatum* Vahl., a reposé essentiellement sur l'intérêt porté aux espèces sahariennes, son utilisation en médecine traditionnelle pour le traitement d'hypotension, fièvre et ulcères d'estomac et enfin le peu d'études effectuées sur cette espèce.

##### 1.1.2. Description de l'espèce

C'est une plante vivace, arbuste ligneux possède une tige poilue, dressée et ramifiée à la base. Porte une longueur de 0,6-1,9 m. ses feuilles sont alternes de surface lisse. Ses fleurs sont pédicellées et leur nombre est environ de dix fleurs / bractées. La couleur des pétales est jaune ou blanche, porte un aspect poilu à sa surface extérieure de longueur 0,2-0,5 cm [1].

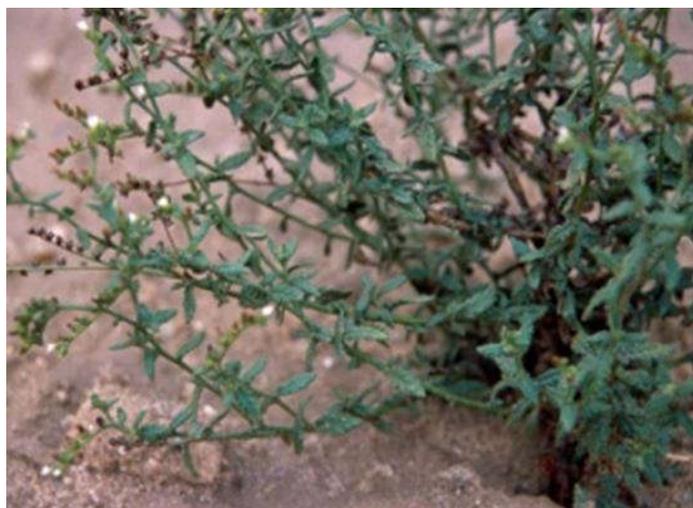


Figure 4.1 : Photo de *Heliotropium undulatum* Vahl.

<http://www.ethnopharmacologia.org/prelude2018/images/heliotropium-bacciferum2.jpg>

### 1.1.3. Synonyme de l'espèce *H. undulatum*

- Synonymes : *Heliotropium bacciferum* Forssk.
- Nom officiel : *Heliotropium undulatum* Vahl
- Nom vernaculaire : sedjrat enshama, sga'a, medeb (Arabe), lebalig, lehbaliya (Berbère) [2].

### 1.1.4. Place dans la systématique

Règne	—————▶	Végétal
Sous règne	—————▶	Eucaryotes
Embranchement	—————▶	Magnoliophyta
Sous-embranchement	—————▶	Angiospermes
Classe	—————▶	Dicotylédones
Ordre	—————▶	Lamiales
Famille	—————▶	Boraginaceae
Genre	—————▶	<i>Heliotropium</i>
Espèce	—————▶	<i>Heliotropium undulatum</i> Vahl [3].

### 1.1.5. Utilisation en médecine traditionnelle

*Heliotropium undulatum* est une espèce qui a été largement employée comme un remède pour plusieurs maladies précisément dans toute l'Afrique et même dans le monde entier, en particulier :

- au Cap-Vert cette plante est utilisée comme cardiotonique [4].
- La médecine traditionnelle du Nord d'Afrique, péninsule Arabique et le Pakistan a montré son effet biologique sur de nombreuses affections de la peau (brulures, abcès, les furoncles et les teignes....etc.) [5].
- En Égypte et au Pakistan, cette espèce est utilisée comme insectifuge contre les insectes des greniers. Elle est également utilisée comme répulsif pour les coléoptères et les insectes de stockage [6].
- Hammiche et al. ont déclaré que la décoction de ses parties aériennes soit efficace sur la morsure de serpent, la gale du chameau et amygdalites.
- En Algérie, et dans la péninsule Arabique, cette plante a été également utilisée comme une source de pâturage aux bétails [5].

### 1.1.6. Travaux antérieurs sur l'espèce *H. undulatum*

La recherche bibliographique menée sur l'espèce *H. undulatum* Vahl. (*H. bacciferum*) a montré que l'espèce algérienne n'a pas été l'objet d'étude chimique ni biologique, à l'exception d'une seule ancienne étude chimique sur l'espèce égyptienne qui a révélé la présence de quatre types d'alkaloïdes pyrrolizidines : héleurine, héliotrine, supinine et europine [7]. Alors que quatre autres études publiées récemment (parallèlement à cette étude), ont rapporté des activités biologiques *in vitro* que nous citons comme suit :

- Une étude sur celle poussant au Pakistan montre, par un screening phytochimique, la présence d'alkaloïdes, des saponines, des tanins, des stéroïdes, des terpénoïdes, des flavonoïdes, des glycosides et les phénols. L'activité antioxydante par la méthode de DPPH des différents extraits a été également mentionnée. Une analyse par GC/MS a mis en évidence la présence d'acides gras tels que l'acide linoléique, l'acide eicosadiénoïque, l'acide oléique et l'acide palmitique en pourcentage élevé [8]. Ce même auteur a rapporté dans une deuxième étude, l'activité antimicrobienne, l'activité antioxydante (DPPH) et une analyse de groupements fonctionnels par la technique FTIR des différents extraits [9].
- Une étude récente sur l'espèce poussant en Iran a rapporté l'effet antibactérien et antifongique des différents extraits *vis-à-vis* de plusieurs espèces bactériens telles que : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Erwinia carotovora* et quelques champignons : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus oryzae* et *Aspergillus fumigatus* [10].
- Une étude sur l'espèce de Soudan a montré que l'extrait dichlorométhane des parties aériennes a causé l'inhibition du volume de l'œdème, après une induction de la carragénine. Cette action inhibitrice et anti-inflammatoire est apparue après deux heures [11].

### 1.2. Matériel végétal et screening phytochimique

Toute cette partie du travail a été réalisée au sein de l'unité de recherche : Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physico-chimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Département de chimie, faculté des sciences exactes, Université des frères Mentouri- Constantine.

### 1.2.1. La matière végétale

Les parties aériennes (tiges et feuilles) de l'*H. undulatum* ont été rassemblées pendant l'étape de fleuraison, en Avril 2010, de la région de Bechar le sud de l'Algérie. Après leur identification par Mr Benabdelhakem (directeur de l'agence de la préservation des ressources naturelles à Bechar, Algérie), un spécimen authentifié, avec le numéro d'identification 04/2010/BHU a été déposé à l'Herbier de l'unité VARENBIOMOL, Université de Frères Mentouri Constantine.

Les échantillons de (tiges et feuilles) sont nettoyés puis mis à sécher à température ambiante dans un endroit aéré à l'ombre pour mieux conserver les molécules sensibles à la chaleur et à la lumière puis pesés.

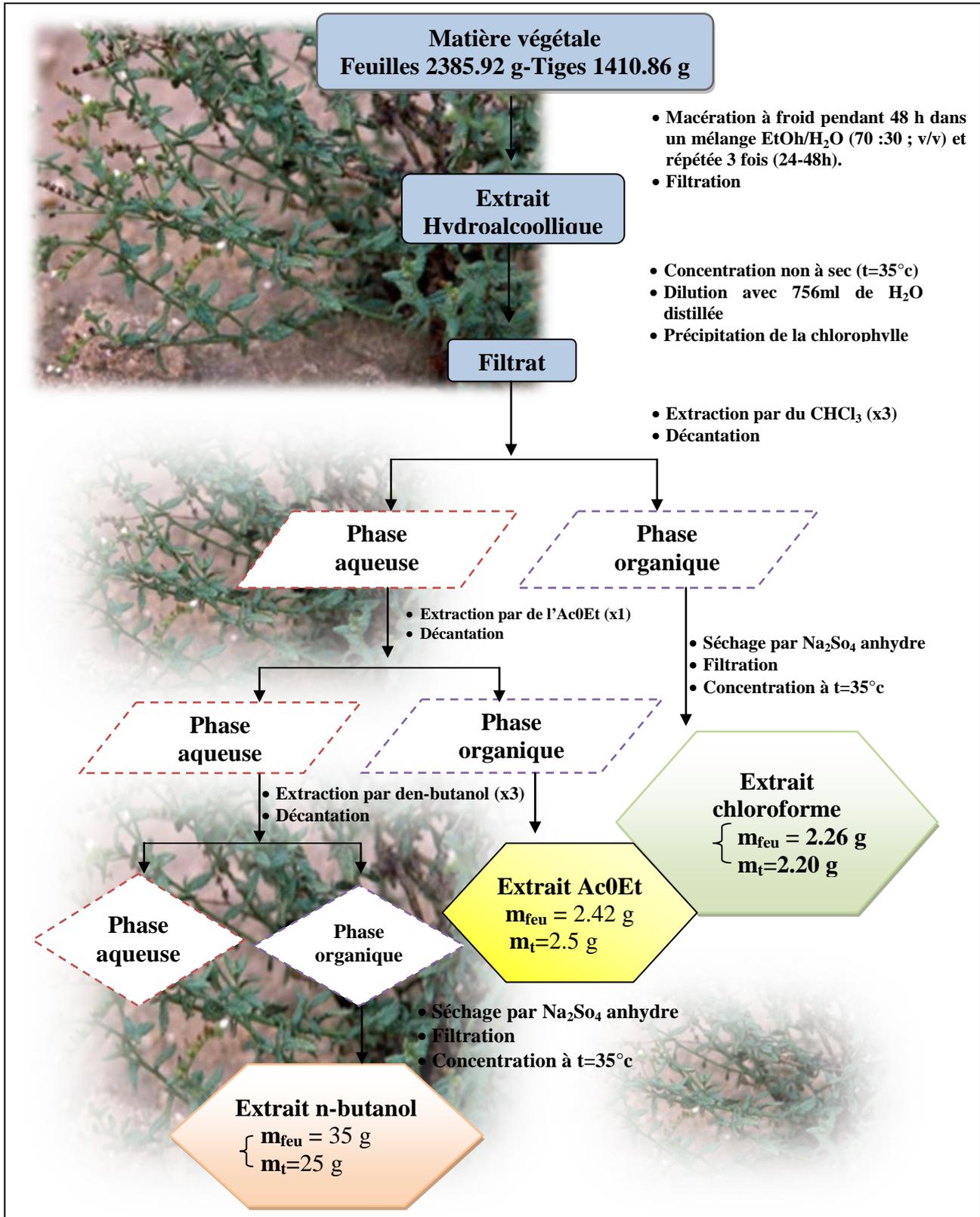
### 1.2.2. Préparation des extraits

Les parties aériennes séchées de *H. undulatum* (Feuilles 2385,92 g -Tiges 1410,86 g) ont été macérées avec un mélange EtOH-H<sub>2</sub>O (70:30 v /v) trois fois pour 24, 36 et 48 heures. L'extrait brut a été concentré à la température ambiante. Ce dernier a été dilué avec 756 mL de H<sub>2</sub>O distillée. Après filtration, la phase aqueuse a été adoptée pour des extractions successives de type liquide-liquide avec de l'éther de pétrole afin d'éliminer la chlorophylle et les cires, le chloroforme (CHCl<sub>3</sub>), l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le n-butanol (n BuOH). Les phases organiques ont été séchées avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. Après filtration et élimination des solvants sous pression réduite, les extraits correspondants ont été obtenus à savoir :

- **Les feuilles**: l'extrait CHCl<sub>3</sub> (2,26 g), EtOAc (2,42 g) et n-BuOH (35 g).
- **Les tiges**: l'extrait CHCl<sub>3</sub> (2,20 g), EtOAc (2,5 g) et n-BuOH (25 g).

Seul l'extrait n-BuOH a été utilisé pour cribler son effet biologique dans la présente étude. En effet, le n-butanol permet une meilleure extraction des composés polaires et concentre mieux les composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tanins et les coumarines [12].

Les différentes étapes de l'extraction des feuilles et des tiges de l'espèce *H. undulatum* sont schématisées dans l'organigramme suivant présenté dans la (figure 4.2).



**Figure 4.2 :** Organigramme résumant les différentes étapes de macération et d'extraction des feuilles et des tiges de l'espèce *H. undulatum*

### 1.3. Analyse qualitative des deux extraits (BEUHS et BEUHL)

Dans le but d'avoir une idée sur le contenu chimique des deux extraits, ces derniers ont été soumis à des tests aussi bien qualitatifs que quantitatifs.

#### 1.3. 1 Screening phytochimique

Le screening chimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une plante ou dans un extrait. Le principe est basé soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration.

Les extraits BEUHS et BEUHL ont été soumis à un criblage phytochimique préliminaire pour mettre en présence leurs différents constituants phytochimiques selon des méthodes standards décrites par Harborne [13], Khandelwal [14], Sofowora [15], et Trease & Evans [16] avec de légères modifications. L'ensemble de ces groupes chimiques comprend les alcaloïdes, les coumarines, les flavonoïdes, les saponosides, les tanins et les terpénoïdes.

##### 1.3.1.1. Test chimique pour les alcaloïdes

La mise en évidence des alcaloïdes a été testée en utilisant trois réactifs différents.

###### A) Réactif de Dragendorff :

Environ 0,2 g de chaque extrait BEUHS et BEUHL a été ajouté à 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2%, ensuite le mélange a été légèrement chauffé dans un bain d'eau pendant 2 à 3 minutes. Le mélange a été filtré et 4-5 gouttes de réactif de Dragendorff ont été ajoutées. L'apparition d'un précipité rouge-orange indique la présence d'alcaloïdes.

###### B) Réactif de Mayer

Environ 0,2 g de chaque extrait a été ajouté à 5 ml de HCl à 1%, ensuite le mélange a été légèrement chauffé dans un bain-marie pendant 2 à 3 minutes. Le mélange a été filtré et 1ml de réactif de Mayer a été ajouté. L'apparition d'un précipité chamois sera une indication de la présence d'alcaloïdes.

##### 1.3.1.2. Test chimique pour les tanins

Environ 0,2 g de chaque extrait BEUHS et BEUHL a été mélangé avec 10 ml d'eau distillée dans un tube à essai et chauffés au bain-marie. Le mélange a été filtré et 4-5 gouttes

de chlorure ferrique à 0,1% ( $\text{FeCl}_3$ ) ont été ajoutées au filtrat. Une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence de tanins.

### 1.3.1.3. Test chimique pour les saponines

Environ 0,2 g de chaque extrait BEUHS et BEUHL a été agité avec 5 ml d'eau distillée et ensuite chauffé à ébullition. L'apparence de la mousse indique la présence de saponines.

### 1.3.1.4. Test chimique des flavonoïdes

Environ 0,2 g de chaque extrait a été dissous dans 2 ml de NaOH à 10%. Un passage du jaune à une solution incolore observée après l'ajout de 0,5 ml de HCl indique la présence de flavonoïdes.

### 1.3.1.5. Test chimique pour les stéroïdes

Environ 0,2 g de chaque extrait a été mélangé avec 2 ml d'anhydride acétique, à ce mélange 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a été ajouté. Le passage de la couleur du violet au bleu ou au vert indique la présence de stéroïdes.

### 1.3.1.6. Test chimique des terpénoïdes (test de Salkowski)

Environ 0,2 g de chaque extrait BEUHS et BEUHL a été mélangé avec 2 mL de chloroforme et 3 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a été soigneusement ajouté pour former une couche. Une coloration brune rougeâtre à l'interface indique la présence de terpénoïdes.

### 1.3.1.7. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de chromatographie planaire dont la phase mobile est liquide. Elle est couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparative). Elle comprend une phase stationnaire (une couche mince de matériel absorbant, usuellement du gel de silice, de l'oxyde d'aluminium ou de la cellulose) et une phase liquide, dite phase mobile ou éluant (un solvant ou un mélange de solvants) qui va entraîner les composés à se séparer le long de la phase stationnaire.

Dans ce travail, les CCM sont effectuées au moyen de couches minces (0.2 mm d'épaisseur) avec un gel de silice 60F<sub>254</sub> (avec indicateur de fluorescence) sur aluminium (Merck). Le criblage qualitatif des deux extraits BEUHS et BEUHL a été fait en utilisant vingt microlitres de chaque échantillon ; Le développement a été réalisé avec différents

systèmes de solvants. La détection a été effectuée à la lumière visible et sous lumière UV ( $\lambda$  254 et 366 nm).

Le rapport entre la distance parcourue par le solvant et le composant a été calculé. Ce rapport est appelé facteur de rétention (Rf). Sachant que cette valeur sera la même pour tous les composants ayant la même identité [17].

Chaque substance a été identifiée par sa fluorescence sous UV, par son facteur de rétention (Rf) dans un système de solvant précis, et par sa couleur après révélation avec les réactifs chimiques.

**Rf**= Distance entre l'origine et la tâche du produit après élution /Distance entre l'origine et le front du solvant après élution.

### 1.3.1.8. La chromatographie préparative

La chromatographie préparative sur papier (CP) est basée sur l'utilisation d'une surface plane de cellulose considérée comme support maintenant par imprégnation une phase stationnaire liquide [18]. Le papier Wattman N° 3 a été utilisé pour établir la carte phénolique à deux dimensions des deux extraits BEUHS et BEUHL. Cette carte est obtenue en faisant migrer l'extrait dans deux solvants, l'un organique et l'autre aqueux [19].

> **La première dimension** est de faire migrer l'extrait dans un système formé de trois solvants à savoir le BuOH: AcOH: H<sub>2</sub>O (BAW) dans les proportions 4: 1: 5 (v/v) appelé système organique.

> **La deuxième dimension** est de faire migrer le même extrait dans le système aqueux qui n'est autre que l'acide acétique à 15% (v/v).

Après développement des chromatogrammes, qui a duré pour la première dimension 17 heures et pour la deuxième dimension 9 heures, les taches ont été délimitées sous la lumière de Wood ( $\lambda = 366$  nm).

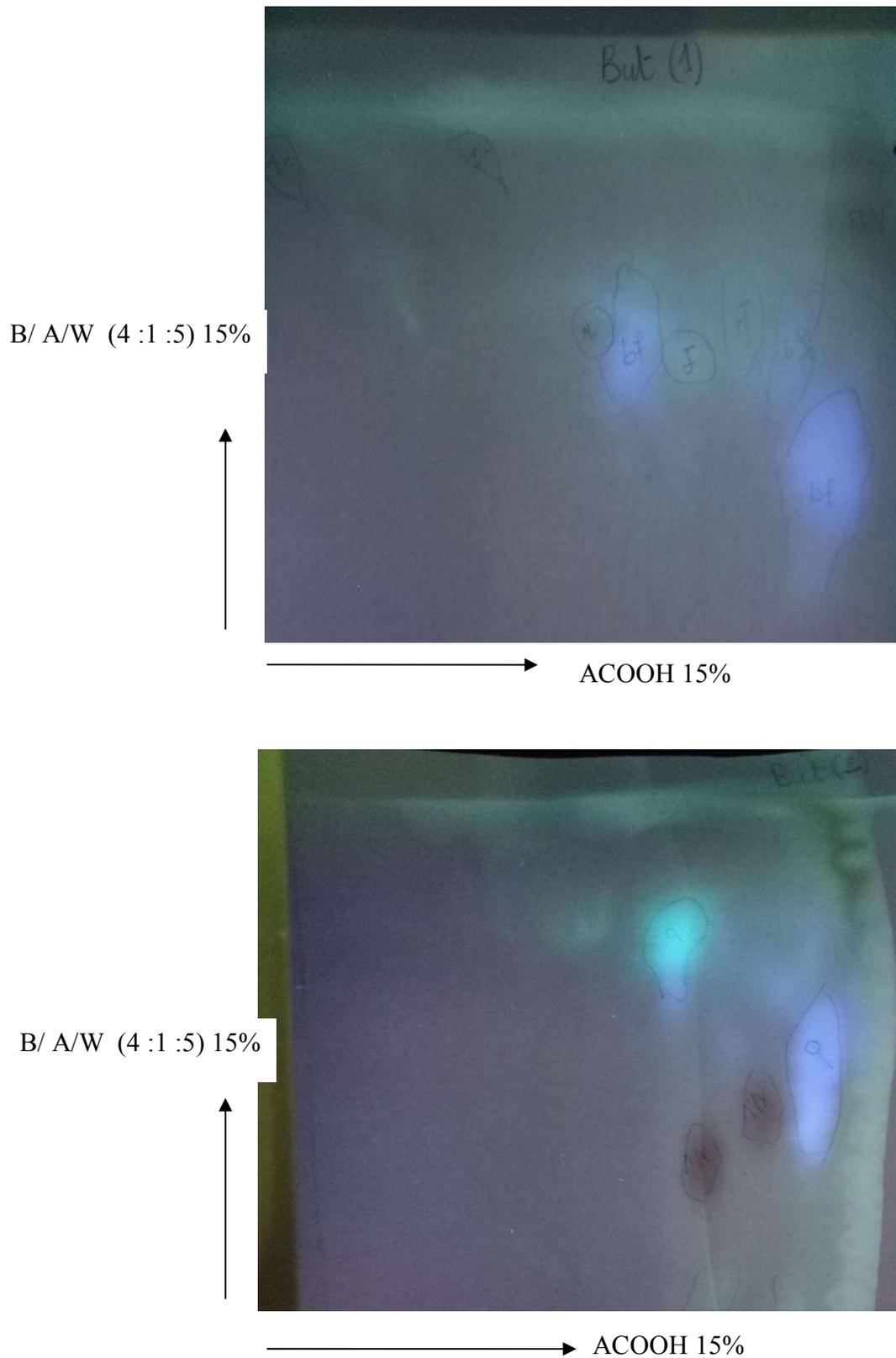


Figure 4.3 : la carte phénolique à deux dimensions réalisée par le papier Wattman N° 3

### 1.4. Analyse quantitative des deux extraits (BEUHS et BEUHL)

#### 1.4.1. Identification de composés phénoliques par HPLC/TOF-MS

L'analyse par HPLC-TOF/MS des deux extraits a été effectuée au laboratoire de recherche, du département de chimie de l'université de Karatekin, Çankiri, Turquie.

Les deux extraits BEUHS et BEUHL de *H. undulatum* ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse munie d'un analyseur à temps de vol (HPLC-TOF/MS), afin de comparer leurs profils chromatographiques avec ceux des standards et d'obtenir une information sur la quantité et la nature chimique des acides phénoliques présents. Cette analyse a été effectuée en utilisant un système HPLC Agilent 1260 Infinity équipé d'un détecteur LC / MS de temps de vol 6210 (TOF) et d'une colonne ZORBAX SB-C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 µm). Les phases mobiles A et B sont respectivement l'eau ultra pure avec de l'acide formique à 0,1% et de l'acétonitrile. Le débit était de 0,6 ml min<sup>-1</sup> et la température de la colonne était de 35 °C. Le volume d'injection était de 10 µl. Le programme du solvant était le suivant : 0-1 min 10% B; 1-20 min 50% B; 20-23 min 80% B; 23-30 min 10% B et le temps total d'évaluation était 30 min.

## 2. Etude Biologique

### 2.1. Etude de l'activité antioxydante

#### 2.1.1 Etude de l'activité antioxydante *in vitro*

##### 2.1.1.1. Effet anti-radicalaire par le test DPPH°

La détermination de l'activité antioxydante est réalisée sur la méthode proposée par Ohinishi et al [20]. 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<sup>+</sup>. En bref, 1 mL d'une 0,2 mM solution méthanolique de DPPH a été mis en incubation avec différentes concentrations de BEHU (0-500 µg/mL). Après une incubation de 30 min à la température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517nm. La vitamine C et la quercitine (0-100 µg/mL) ont été également utilisés comme références. L'effet antioxydant des extraits est exprimé en pourcentage de réduction de DPPH° selon la formule suivante : % de réduction = [(Abs contrôle - Abs échantillon) / Abs contrôle] x 100%. Abs contrôle : Absorbance du contrôle (contenant tous les réactifs excepté le composé d'essai). Abs échantillon: l'absorbance de l'extrait ou standard (1)

##### 2.1.1.2. L'activité de piégeage de radical Hydroxyl (°OH)

L'activité de piégeage de radical hydroxyle était évaluée par la méthode désoxyribose décrite par Halliwell *et al.* [21]. Le radical hydroxyl a été généré en incubant les éléments suivants : dans un volume final de 1,2 mL de 10 mM de tampon phosphate (pH7.4) à 37 °C pendant 60 min: mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.4, 100 µM de FeCl et 2,8 mM désoxyribose, 100 pM d'EDTA et 100 pM d'acide ascorbique en présence ou l'absence (contrôle) de l'extrait. La dégradation du désoxyribose sucre induite par le radical hydroxyle a été déterminée par addition de 1mL de TBA (1%) et 1 mL de TCA (5%); le contenu a été bien mélangés et bouilli à 100 °C pendant 20 min. Le chromogène rose formé était déterminée en mesurant son absorbance à 535 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard. Le pourcentage d'inhibition de l'hydroxyle est calculé selon l'équation (1).

##### 2.1.1.3. L'activité chélation du fer

L'effet chélateur des ions ferreux Fe<sup>2+</sup> a été estimée selon la méthode décrite par Dinis *et al.*, [22]. Un volume de 1 mL de chaque solution d'extrait (0-600 µg/mL) ou du chélateur de référence l'EDTA (0-200 µg/mL) a été initialement mélangés avec 50 µL de chlorure de fer (FeCl<sub>2</sub>) (2 mM). Après 1min, 200 µL de Ferrozine (5 mM) ont été ajoutées au milieu

réactionnel. Le mélange a été vigoureusement agité et laissé au repos à la chambre de température pendant 10 min, permettant ainsi la complexation du fer résiduel et la formation d'un chromophore rouge (Fe(II)-Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à  $\lambda=562$  nm.

Le pourcentage d'inhibition de complexe ferrozine- $Fe^{2+}$  était calculée selon l'équation (1).

### 2.1.1.4. Détermination de pouvoir réducteur du Fer

Le pouvoir réducteur de l'extrait des feuilles et tiges a été déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu, 1986 [23]. Différentes concentrations des extraits (2,5 mL) ont été mélangées avec 2,5 mL de tampon phosphate de sodium à 200 mmol/l (pH 6,6) puis 2,5 mL de ferricyanure de potassium à 1%. Le mélange a été incubé à 50 ° C au bain marie pendant 20 min. Un volume de 2,5 mL d'acide trichloracétique à 10% (p/v) est ensuite ajouté, puis le mélange est centrifugé à 650 tr/min pendant 10 min. 5 mL de surnageant ont été mélangé avec 5 mL d'eau distillée et 1 mL de chlorure ferrique à 0,1%. L'absorbance a été mesurée à 700 nm : une absorbance plus élevée indique une puissance de réduction plus élevée. La quercitine a été utilisée comme référence. Le pourcentage de pouvoir réducteur de fer est calculé par l'équation (1).

### 2.1.2. Evaluation de l'activité antioxydante *in vivo* et hépatoprotective

#### 2.1.2.1. Evaluation de la fonction hépatique

Après avoir réalisé l'étude de toxicité aiguë par voie orale, la dose de BEHU des deux factions BEHUL et BEHUS (200 mg / kg) a été sélectionnée pour l'étude *in vivo*.

#### ❖ Animaux et protocole d'expérimentation

Des rats mâles Wistar pesant entre (180-220 g) ont été utilisés dans cette expérimentation. Ils sont placés aléatoirement dans des cages standard pour une période d'adaptation (3 semaines) avant d'être utilisés dans les expériences. L'élevage est fait au niveau de l'animalerie du laboratoire de recherche de Biotechnologie des Molécules Bioactives et de Physiopathologie (LBMBPC) où les rats ont été logés dans des cages en Plexiglas (5 rats par cage) dans un cycle 12/12 de lumière/obscurité, dans des conditions de laboratoire standard (température ambiante de  $20 \pm 2$  °C et de l'humidité  $72 \pm 4\%$ ) avec un accès libre à l'eau et la nourriture de type ad libitum. Leurs poids corporels ont été enregistrés quotidiennement.

#### ❖ Induction de l'hépatotoxicité et traitement des rats

Les animaux ont été divisés en cinq groupes dont chacun rassemble 5 rats.

**Groupe I (groupe contrôle) :** les rats témoins qui reçoivent quotidiennement par gavage de l'eau physiologique (NaCl 0.9%) pendant 11 jours.

**Groupe II (contrôle négatif) :** Dans ce groupe les rats ont reçu du NaCl (0.9 %) pendant 10 jours ; le 11<sup>ème</sup> jour les rats ont été injectés par la voie intra-péritonéale (ip) par une dose unique de 300 mg/Kg de l'hydrazine .

**Groupe III (groupe traité) :** Dans ce groupe les rats ont été prétraités par voie orale avec l'extrait des tiges de *H.undulatum* (BEHUS) pendant 10 jours par une dose 200 mg/Kg. Le 11<sup>ème</sup> jour ils reçoivent une injection de l'hydrazine en ip à la dose 300 mg/Kg.

**Groupe IV (groupe traité) :** Dans ce groupe les rats ont été prétraités par voie orale avec *H.undulatum* extrait de feuille (BEIHL) pendant 10 jours par une dose 200 mg/Kg. Le 11<sup>ème</sup> jour ils reçoivent une injection de l'hydrazine en ip.

**Groupe V (contrôle positif) :** Les rats de ce groupe reçoivent quotidiennement par voie orale la vitamine E à la dose 100 mg/kg pendant 10 jours. Le 11<sup>ème</sup> jour ils reçoivent une injection de l'hydrazine en ip.

### 2.1.2.2. Marqueurs de l'hépatotoxicité

Après le prélèvement sanguin, les échantillons ont été centrifugés à 4000 rpm pendant 15 min, en séparant le sérum des autres composants. L'alanine amino-transférase (ALT), l'aspartate-amino transférase (AST), l'alcaline phosphatase (ALP) et la bilirubine totale ont été estimés dans le sérum recueilli. Étant donné que ces enzymes sont révélateurs des lésions hépatiques. Le dosage des 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.

### 2.1.2.3. Evaluation du statut oxydatif cytosolique

#### - Préparation des fractions hépatiques

A la fin du traitement, les animaux de tous les groupes ont été sacrifiés et rapidement disséqués afin d'enlever le foie. Par la suite le foie a été nettoyé et le sang résiduel des vaisseaux hépatiques sera éliminé par administration d'une solution d'eau physiologique introduite directement dans la veine hépatique puis séché avec un papier de soie propre, et pesé par la suite. Enfin, le foie est séparé en quatre portions dont l'une est destinée pour l'évaluation biochimique du statut oxydatif dans le cytosol, la deuxième pour les dosages concernant les mitochondries, la troisième est préservé pour l'étude histologique. Toutes les portions ont été conservées à -80 °C pour d'autres analyses ultérieures.

### -Préparation de la fraction cytosolique

Le foie de chaque rat a été bien lavé avec le NaCl (0.9%) séché et coupé en petits morceaux, pesés et homogénéisés (pour 1 g du foie dans 9 ml de solution tampon phosphate 0.1 M pH=7.4) contenant KCl (1.15%). L'homogénat a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min à 4°C, le surnageant récupéré a été centrifugé à 9600 rpm pendant 45 minutes à 4 °C. La fraction cytosolique (le surnageant) a été utilisée pour le dosage des marqueurs du stress oxydatif.

### 2.1.2. 3.1.Détermination de la peroxydation lipidique (MDA)

La peroxydation lipidique a été évaluée par le taux du MDA selon la méthode d'Ohkawa *et al.* [24]. 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. Les résultats sont exprimés en nmol par gramme de foie.

### 2.1.2. 3.2.Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique

La catalase est une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en dioxygène selon la réaction suivante :



La catalase cytosolique a été dosée colorimétriquement à  $\lambda=240$  nm et exprimée en moles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommée/min/mg de protéines selon la méthode d'Aebi [25]. La réaction est basée sur la disparition du l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 25 °C en présence de la source enzymatique dans la fraction cytosolique. La quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> décomposée est directement proportionnelle à la concentration en substrat et la concentration en enzyme. L'activité de l'enzyme est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire : 0.043 cm<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>. Les résultats sont exprimés en U/mg de protéine hépatique (U:  $\mu\text{mol}$  d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommé par minute par mg de protéines).

### 2.1.2.3.3. Dosage de l'activité enzymatique de superoxydedismutase (SOD) cytosolique

La superoxyde dismutase est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. L'activité enzymatique de SOD cytosolique a été déterminée selon la méthode décrite par Flohe [26]. Cette activité est attribuée à la capacité inhibitrice de l'auto-oxydation du pyrogallol par la SOD exprimée en U/mg de protéine du tissu hépatique. L'activité de l'enzyme est exprimée en U/mg de protéine

du tissu hépatique. 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 :

$$\text{Inhibition totale} = \frac{\text{DO (blanc)} - \text{DO(échantillon)}}{\text{DO (blanc)}} \times 100$$

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

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

### 2.1.2.3.4. Dosage de l'activité du glutathion réduit (GSH) cytosolique

Le GSH a été évaluée en utilisant la méthode décrite par d'Ellman [27]. Le GSH est un facteur déterminant de la sensibilité des tissus aux dommages oxydatifs. Le principe de cette activité consiste à scinder la molécule d'acide 5,5'dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH et la libération de l'acide thionitrobenzoïque (TNB) qui est caractérisé par un pH (8-9) et présente une absorbance maximale à  $\lambda=412$  nm. Les résultats sont déduits en se basant sur un coefficient d'extinction molaire de GSH  $13100 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ . Les concentrations sont exprimées en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéine hépatique

### 2.1.2.3.5. Dosage de l'activité du glutathion réductase (GR) cytosolique

L'activité du glutathion réductase (GR) a été mesurée selon la méthode de Coballase-Urrutia et ses collaborateurs [28]. Cette activité basée sur la réduction du GSSG en GSH par le NADPH en présence de GR est mesurée par 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 :  $6.25 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ . Les résultats sont exprimées en U/mg de protéine hépatique (U :  $\mu\text{mol}$  NADPH oxydé/min)

### 2.1.2.3.6. Dosage de l'activité du glutathion-S-transfér ase (GST) cytosolique

Le dosage de l'activité du glutathion-S-tranferase (GST) cytosolique GSH a été évaluée en utilisant la méthode décrite par Seyyedi et ses collaborateurs [29]. Les GST est une enzyme qui fixe et métabolise le glutathion. La réaction de conjugaison entre le glutathion et le 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) est catalysée par les GST. Cette réaction de conjugaison se fait par l'intermédiaire du groupement thiol du glutathion. L'augmentation de l'absorption est directement proportionnelle à l'activité GST de l'échantillon. L'activité de GST est déterminée par la mesure du produit (GS-DNB) à  $\lambda=340$  nm issu de la réaction de conjugaison du CDBN avec du 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:  $\mu\text{mol}$  de conjugué CDBNformé/min).

### 2.1.2. 3.7. Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GPx) cytosolique

Le dosage de la GPx a été déterminé selon la méthode décrite par Rotruck *et al.* [30]. Les GSH-Px constituent la voie majeure de dégradation des hydroperoxydes (peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydroperoxydes organiques ROOH) dans la plupart des cellules et des compartiments subcellulaires. La GPx de l'homogénat tissulaire oxyde le glutathion et réduit le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O. Le reste de la quantité du glutathion réagit avec la solution DTNB pour donner un substrat coloré qui est mesuré par spectrophotométrie à  $\lambda=420$  nm. L'activité de GPx est exprimées en U/mg protéine de foie (U:  $\mu\text{mol}$  de GSH oxydé/min).

### 2.1.2. 4. Evaluation du dysfonctionnement mitochondrial in vivo

#### 2.1.2. 4.1. Isolement des mitochondries du foie

L'isolement des mitochondries du foie repose sur le fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle suivant le protocole décrit par [30].

La partie du foie réservée pour 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 1g 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  $\mu\text{L}$  de tampon de respiration (saccharose 50 mM, HEPES 10 mM, KCl 100 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, pH=7.4) au moyen d'un potter manuel par un simple aller/retour du piston.

#### - Préparation de la matrice mitochondriale

Les pellets de mitochondries re-suspendus dans la même solution tampon est utilisée pour l'extraction de la matrice mitochondriale par congélation et décongélation suivi immédiatement par homogénéisation répétée des préparations fraîches mitochondriales afin d'éclater les mitochondries. Après centrifugation à 10000 rpm pendant 10 min, le surnageant obtenu est considéré comme source de la matrice pour le dosage du statut oxydatif mitochondrial. Le dosage des protéines dans les fractions mitochondriales est réalisé par la méthode de Lowry [31].

### Evaluation du statut oxydatif mitochondrial

Le statut oxydatif mitochondrial a été estimé dans un volume de 0.5 ml qui correspond à la fraction mitochondriale en utilisant les méthodes enzymatiques colorimétriques décrites précédemment. Le MDA a été évalué par la méthode de d'Ohkawa et ses collaborateurs [24]. Le dosage de GSH est effectué par la méthode d'Ellman [27], les résultats sont exprimés en nmol/mg protéine. L'activité du GPx est évaluée par la méthode de Rotruck et ses collaborateurs [30], La SOD est estimée par la méthode décrite par Flohe [26], les résultats sont exprimés en (U/mg protéine).

### 2.1.2. 5. Evaluation de l'activité du CYP2E1

#### 2.1.2. 5. 1. Préparation de la fraction microsomale

Pour préparer la fraction microsomale une homogénéisation d'un fragment du foie a été effectuée dans un tampon contenant du trisacétate 0,1 M (pH 7,4), du KCl 0,1 M, de l'EDTA 0,1 mM, du fluorure de phénylméthylsulfonyl 230 M et de l'hydroxytoluène butyle 22,7M. Les homogénats ont été centrifugés à  $100000 \times g$  pendant 1 h à 4 °C. Le culot résultant a été lavé avec 0,15 M de KCl et remis en suspension dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4) contenant 20% (v / v) de glycerol et 1 mM d'EDTA et stocké à -80 °C pour la mesure de l'activité CYP2E1. La concentration a été déterminée en utilisant la protéine microsomale décrite par la méthode de [31], en utilisant le BSA comme un standard.

#### - La détermination de l'activité du CYP2E1

L'activité du CYP2E1 a été mesurée par la vitesse d'oxydation du p-nitrophénol en p-nitrocatechol, en présence de NADPH et d'O<sub>2</sub>. L'oxydation du p-nitrophénol a été déterminée en utilisant 200 ug d'homogénat, et dans un système réactionnel contenant 2 mM de nitrophénol dans un tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), 5 mM de MgCl<sub>2</sub> et un système générateur de NADPH constitué de 0,4 mM de NADP<sup>+</sup>, 30 mM isocitrate, 0,2 U d'isocitrate déshydrogénase, incubés à 37 °C et arrêtés après 60 min par addition de 30 uL d'acide trichloroacétique à 20%. Le surnageant a été traité avec 10 µL d'hydroxyde de sodium 10 M. L'absorption à 546 nm a été immédiatement mesurée et la concentration en 4-nitrocatechol a été déterminée ( $\epsilon = 10,28 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La protéine microsomale a été déterminée par la méthode [31] en utilisant le BSA comme un standard [32].

### 2.2. Etude de l'activité antioxydante

#### 2.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de BEHU

L'inflammation est un processus d'un mécanisme de défense du corps, c'est une cascade d'événements biochimiques qui, impliquant le système vasculaire local, le système immunitaire, et diverses cellules dans le tissu blessé, propage et donne la réponse inflammatoire [33].

#### 2.3. 1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de BEHU in vitro

##### 2.3. 1.1. Détermination de l'effet de piégeage du radical d'oxyde nitrique (NO°)

Le radical d'oxyde nitrique a un rôle important dans divers types de processus inflammatoires. Le piégeage du NO° a été déterminé selon la méthode de Sreejayan et Rao [34] basée sur la réaction de Griess. Le mélange réactionnel contenant 3 mL de nitropruside de sodium (SNP) (0.2 M) est préparé dans un tampon phosphate avec une concentration différente des extraits de *H. undulatum* (50 à 1300 µg/mL). Et incubé 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<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a été ajouté à 0.5 ml de mélange réactionnel puis incubés à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. L'absorbance du chromophore formé est mesurée à  $\lambda=546$ . La quantité de nitrite a été calculée à partir de la courbe standard basée sur des solutions de nitrite de sodium. Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule (1).

##### 2.3. 1.2. Inhibition de la dénaturation des protéines: activité anti-arthritique

L'effet préventif de l'extrait n-BuOH de *H. undulatum* contre la dénaturation de l'albumine membranaire induite par la chaleur a été évalué in vitro selon la méthode décrite par Sakat et ses collaborateurs [35]. La mesure de la turbidité a été faite à  $\lambda=660$  nm par spectrophotométrie. Les résultats ont été comparés aux celles du diclofénac, anti-inflammatoire non stéroïdien de référence. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine est calculé selon la formule suivante :

##### 2.3. 1.3. Stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC)

Cette technique consiste à un dosage in vitro pour évaluer l'effet préventif des extraits n-BuOH de *H. undulatum* contre la lyse membranaire des globules rouges (HRBC) induite par l'hypotonie [36]. 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 (1).

## 2. 4.Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de BEHU invivo

### 2.4.1.Induction de l'œdème dans la patte par la carragénine

Cette expérience a été effectuée selon le protocole de Srivastava et ses collaborateurs [37]. L'étude a été réalisée sur des rats Wistar Albinos provenant de l'élevage au niveau de l'animalerie de l'Université des Frères Mentouri Constantine. Les rats (200-220 g) sont regroupés en cinq par lot . Les animaux sont mis à jeun 12 heures avant l'administration des produits. Les animaux ont été répartis en quatre groupes :

- Groupe 1 : les rats témoins qui reçoivent par gavage de l'eau physiologique.
- Groupe 2 : les rats reçoivent oralement diclofénacde sodium à une dose de 10 mg/kg.
- Groupe 3 : les rats reçoivent l'extrait BEHULpar gavage à une dose de 200 mg/kg.
- Groupe 4 : les rats reçoivent l'extrait BEHUS par gavage à une dose de200 mg/kg.

Une heure plus tard, l'inflammation a été provoquée par l'injection de 0.1 ml de carragénine (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 uneheure avant l'induction de l'œdème et (à 1, 3, et 5h) après l'injection de la carragénineutilisant le vernier caliper numérique. L'œdème a été traduit par une augmentation enépaisseur des pattes (mm) due à la provocation inflammatoire. Pour chaque groupe traité, les diamètres moyens obtenus à ces différents relevés, extrait ou diclofénac, (Dt) ont étécomparés à celui obtenu avant tout traitement (D0).

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est calculé pour chaque groupe des rats traités par rapport au témoin.il est obtenu par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [(Dt - D0) \text{ témoin} - (Dt - D0) \text{ traité}] / (Dt - D0) \text{ témoin} \times 100$$

### 2.4.2. Détermination dutaux en protéine carbonyle

Le dosage de la protéine carbonyle a été déterminé selon la méthode décrite par Levine *et al.* avec modification [38]. Le tissu a été homogénéisé dans 1 mL de tampon phosphate froid, pH 6.7 contenant 1 mM d'EDTA, puis centrifugé à 10 000 x g pendant 15 minutes à 4 °C. le principe basé sur la mesure spectrophotométrique des dérivés de 2,4-

dinitrophénylhydrazine (DNPH) des protéines carbonyles permet de quantifier la teneur en protéines carbonyles. Brièvement, 100 uL d'homogénat ont été incubés soit avec 500 uL de DNPH soit avec du HCl 2 N (blanc) pendant 1 heure à température ambiante. Les échantillons ont été ensuite réprecipités avec 600 uL d'acide trichloroacétique à 20% (TCA), incubés pendant 5 minutes sur de la glace et ensuite extraits avec de l'éthanol / acétate d'éthyle (1: 1, v / v), 3 fois à 11 000 xg pendant 10 minutes. Les résultats sont exprimés en nmol/mg protéines.

### 2.4.3. Détermination de l'activité de la myéloperoxydase hépatique (MPO)

L'activité de MPO hépatique a été mesurée selon Schierwagen et al. En bref, une quantité de foie (50-100 mg) a été utilisée dans 6 mL de tampon phosphate 50 mmol/L (pH 6,0) contenant 1% HTAB. Les échantillons ont été homogénéisés et l'homogénat a été décongelé et ensuite centrifugé (4500 xg pendant 15 minutes à 4 °C). L'activité de MPO dans le surnageant (0,1 mL) a été déterminée après l'addition de 0,6 mL de tampon phosphate (pH 6,0) contenant 0,167 mg / mL d'O-dianisidine dihydrochlorure et 0,0005% de peroxyde d'hydrogène. Le changement d'absorbance à 460 nm sur 10 minutes a été mesuré. L'unité de l'activité MPO a été définie comme la quantité d'enzyme pouvant réduire 1 u mole de peroxyde par minute. 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. [39].

### 2.4.4. Détermination du taux de l'oxyde nitrique (NO) hépatique

Pour déterminer le taux de la production du NO la concentration de nitrate a été mesurée selon le protocole de conversion du nitrate grâce à la réaction de Griess [34]. L'absorption a été mesurée à  $\lambda=540 \text{ nm}$  et la teneur en nitrite a été calculée en se basant sur standard, nitrite de sodium  $\text{NaNO}_2$ . Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{M}$  d'oxyde nitrique (NO) [40].

### 2.4.5. Le dosage immuno-enzymatique pour l'estimation du taux de TNF- $\alpha$ et IL- $\beta$

Les quantifications du TNF- $\alpha$  et de l'IL- $\beta$  ont été effectuées dans la fraction cytosolique du foie des rats traités par l'hydrazine. Le dosage immunologique du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  est réalisé par l'ELISA en phase solide. Un anticorps monoclonal spécifique du TNF- $\alpha$  ou IL- $\beta$  de rat a été pré-enrobé dans la microplaque. Les échantillons sont pipetés dans les puits et le TNF- $\alpha$  ou IL- $\beta$  de rat présent est lié par l'anticorps immobilisé. Après le

lavage toute substance non liée est éliminée, un anticorps polyclonal lié à une enzyme spécifique du TNF-  $\alpha$  ou de l'IL-  $\beta$  est ajouté aux puits. Suivant un lavage pour éliminer tout réactif anticorps-enzyme non lié, une solution de substrat est ajoutée aux puits. La réaction enzymatique donne un produit bleu qui devient jaune lorsque la solution d'arrêt est ajoutée. L'intensité de la couleur mesurée est proportionnelle à la quantité de TNF-  $\alpha$  ou IL- $\beta$  est liée dans les étapes initiales. Les valeurs d'échantillon sont ensuite lues sur la courbe standard. Les résultats sont exprimés en pg / mg de protéine [41].

### 2.5. Etude histologique

Les petits morceaux de foie 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 $\mu$ m) et subis une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (x 40).

### 2.6. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. Les valeurs IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par régression semi logarithmique. Pour les tests *in vivo* les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD. 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.

### Références bibliographiques

- [1] El-Gazzara A, El-Ghamery A, El-Saied A, Khattab A H, El-Kady A A. Computer-generated keys to the flora of Egypt. The Boraginaceae. *Annals of Agricultural Sciences*. 2015 ; 60(1) : 67-85
- [2] Bellakhdar J. Médecine traditionnelle et toxicologie ouest-saharienne, contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. Edition techniques nord-africaines. 1978 ; 357-356
- [3] Valdés, B. Boraginaceae. *Heliotropium bacciferum* Forssk. 2011 ; *Fl. Aegypt. Arab*, 38. 1775.
- [4] Rahimifard N, Bagheri E, Asgarpanah G, Balajadeh BK and Yazdi HR. Antibacterial activity of total extract, petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and aqueous fractions of aerial parts of *Heliotropium bacciferum*. *JMP* .2014; 4(52): 122-135.
- [5] Hammiche V, Maiza K. 2006. Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol*. 105:358–367.
- [6] Ali Esmail Al-Snafi. Pharmacological and toxicological effects of *heliotropium undulatum* [h.bacciferum] and *heliotropium europeum* – a review, *IAJPS* 2018; 05 (04): 2150-2158.
- [7] Farrag NM, Abdel-Aziz EM, El-Shafae AM, Ateya and El Domiaty MM. Pyrrolizidine alkaloids of *heliotropium bacciferum* forssk from egypt. *International Journal of Pharmacognosy*, 1996 ; 34(5) : 374-377.
- [8] Ahmad S, Ahtaram Bibi A et al, .Phytochemical Analysis, Antioxidant Activity, Fatty Acids Composition, and Functional Group Analysis of *Heliotropium bacciferum*. *The Scientific World Journal*, 2014; 8(4): 531-639.
- [9] Ahmad S, Abd El-Salam NM and Ullah R. In vitro antimicrobial bioassays, DPPH radical scavenging activity, and FTIR spectroscopy analysis of *Heliotropium bacciferum*. *Biomed Res Int*, 2016; 12(5):229-333
- [10] Rahimifard N, Bagheri E, Asgarpanah G, Balajadeh BK and Yazdi HR. Antibacterial Activity of Total Extract, Petroleum Ether, Chloroform, Ethyl Acetate and Aqueous Fractions of Aerial Parts of *Heliotropium bacciferum*. *Journal of Medicinal Plants*, 2014; 4(52): 122-135.
- [11] Mohammed MS, Khalid HS, Muddathir AE, El Tahir K, Khan AA, AbdAlgadir H, Osman WJA and Siddiqui NA. Effect of some plants' extracts used in Sudanese folkloric medicines on carrageenan-induced inflammation. *Pak J Pharm Sci*, 2015; 28(1):159-165.
- [12] Sarr M., Ngom S., Kane M.O., Wele A., Diop D., Sarr B., Gueye L., Andriantsitohaina R., Diallo A.S. In vitro vasorelaxation mechanisms of bioactive compounds extracted from *Hibiscus sabdariffa* on rat thoracic aorta. *Nutr. Metab*. 2009 ;6(45) ;411–416

- [13] Harborne IB. 3rd edn. London: Chapman and Hall; 1998. *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis*; p. 302.
- [14] Khandelwal KR. *Preliminary phytochemical screening in practical pharmacognosy techniques and experiments*. 8th ed. Pune: Nirali Publication, 2001; 149-156.
- [15] Sofowora A. *Medicinal Plants and Traditional Medicinal in Africa*. 2nd Ed. Sunshine House, Ibadan, Nigeria: Spectrum Books Ltd; 1993. *Screening Plants for Bioactive Agents*; 134–156.
- [16] Trease GE, Evans WC. *Pharmacognosy*. 15th Ed. London: Saunders Publishers; 2002. pp. 42–44, 221–229, 246–249, 304–306, 331–332, 391–393.
- [17] Colin F. Poole . *The Essence of Chromatography* 2003. ISBN: 978-0-444-50198-1
- [18] Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970), *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.
- [19] Ahmed AA, El-Sayed NH, El-Negoumy SI and Mabry TJ. 1987. Flavonoids of *Cotula cinerea*. *J Nat Prod*, 50: 519-520.
- [20] Ohinishi M, Morishita H, Iwahashi H, et al. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry*, 1994; 36:579-583.
- [21] Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem*, 1987; 165(1):215-219.
- [22] Dinis TC, Madeira 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(1):161-169.
- [23] Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *J. Nutrit*, 1986; 44:307–315.
- [24] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979; 95:351-358.
- [25] Aebi H. Catalase in vitro. *Method Enzymol*, 1984; 105:121-126.
- [26] Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Method Enzymol*, 1984; 105:114-121.
- [27] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959; 82:70-77.
- [28] Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, et al. Hepatoprotective effect of acetonic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 2011; 63:363-370.

- [29] 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.
- [30] Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 1973; 179:588-590.
- [31] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 93:265-275.
- [32] Humana Press, Totowa NJ, Chang T K H, Crespi C L, Waxman D J. Spectrophotometric analysis of human cyp 2E1-catalyzed p-nitrophenol hydroxylation. In *Methods in Molecular Biology. Cytochrome P450 Protocols*, I. R. Phillips, and E. A. Shephard, Eds, 1998; 107: 147-152.
- [33] Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev*, 2007; 65(12 Pt 2): 140-146.
- [34] Sreejayan N, Rao MN. Nitric oxide scavenging by cucuminoids. *J Pharm Pharmacol*, 1997; 49:105-107.
- [35] 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.
- [36] Chippada SC, Volluri SS, Bammidi SR, Vangalapati M. In vitro anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Centella asiatica* by HRBC membrane stabilization. *Rasayan J Chem*, 2011; 4:457-460.
- [37] 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.
- [38] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman D. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *ER. Methods Enzymol*, 1990; 186: 464-78.
- [39] Schierwagen C, Blyund-Fellenous A C, Lundberg C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase. *J. Pharmacol. Methods*, 1990; 23:179–186.
- [40] Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*, 2007; 43:645-657.
- [41] Agay D, Andriollo-Sanchez M, Claeysen R, Touvard L, Denis J, Roussel AM, Chancerelle Y. Interleukin-6, TNF-alpha and interleukin-1 beta levels in blood and tissue in severely burned rats. *Eur Cytokine Netw*, 2008; 19(1):1-7

Troisième Partie  
RESULTATS ET DISCUSSION

# Chapitre 5

## Résultats et discussion

### 1. Etude chimique de l'espèce *Heliotropium undulatum*

#### 1.1. Analyse qualitative des extraits BEUHL et BEUHS

##### 1.1.1. Screening phytochimique

Les résultats préliminaires du criblage phytochimique des extraits BEUHL et BEUHS sont présentés dans les (tableaux 5.1 et 5.2). L'analyse de BEUHS a montré une présence importante des saponosides, triterpénoïdes, stérols, flavonoïdes, tanins et coumarines. Tandis que des résultats négatifs ont été observés pour les alcaloïdes. En ce qui concerne l'extrait BEUHL, le criblage phytochimique a montré une forte présence des flavonoïdes, des triterpénoïdes, des stérols, des tanins et des saponosides, tandis que les alcaloïdes ont été détectés en traces. Les résultats ont été négatifs pour les coumarines.

Tableau 5.1 : Résultats du criblage phytochimique préliminaire de BEUHL

Classes de substances naturelles recherchées	Observations	Interprétation
Les flavonoïdes	Couleur rouge avec dégagement de chaleur	+++
Les stérols et triterpènes	Couleur rouge brunâtre	++
Les saponosides	Apparition d'une mousse	++
Les alcaloïdes -test de Mayer -test de Dragendorff	Apparition d'un précipité brun Absence de précipité	+ -
Les tanins Avec le FeCl <sub>3</sub> (1%) Avec l'acétate de Pb Avec de K <sub>2</sub> CrO <sub>2</sub>	Apparition d'un précipité vert foncé Un précipité brun Un précipité rouge brun	+++ +++ +++
coumarines (ajout de NH <sub>4</sub> OH)	pas de fluorescence	-

Tableau 5.2 : Résultats du criblage phytochimique préliminaire de BEUHS.

Classes de substances naturelles recherchées	Observation	Interprétation
Les flavonoïdes	Couleur rouge avec dégagement de chaleur	++
Les stérols et triterpènes	Couleur rouge brunâtre intense	+++
Les saponosides	Apparition d'une mousse intense	+++

Les alcaloïdes -test de -test de Dragendorff	Un léger précipité brun Absence de précipité	+ -
Les tanins Avec le FeCl <sub>3</sub> (1%) Avec l'acétate de Pb Avec de K <sub>2</sub> CrO <sub>2</sub>	Un précipité vert Un précipité brun Un précipité rouge brun	++ ++ ++
coumarines (ajout de NH <sub>4</sub> OH)	Précipité brun avec fluorescence sous UV (365nm)	++

(+) : présence, (++) présence moyenne, (+++) forte présence, (-) absence.

D'après les deux tableaux, l'ensemble des groupes chimique est présent dans les deux extraits à concentrations variables. Les coumarines sont présentes dans l'extrait BEUHS mais absentes de l'extrait BEUHL. Seuls les alcaloïdes sont absents des deux extraits.

### 1.1.2. Analyse par chromatographie sur couche mince

Le résultat du criblage phytochimique effectué sur les extraits BEUHL et BEUHS au moyen de la CCM a mis en évidence la présence de nombreux spots. Le nombre de spots varie en fonction de l'extrait testé et du système d'élution utilisé. Ces spots se distinguent entre eux par la valeur du rapport frontal (Rf) et de leurs colorations avant et après révélations .

Les spots de coloration bleu fluorescent, bleu verdâtre, jaune, rose, noir violet observées sur les chromatogrammes sous UV (254 et 366 nm et après révélation) peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les coumarines et les acides phénoliques. Alors que les alcaloïdes sont totalement absents. Il est à noter que les CCM ont été révélées avec des réactifs spécifiques aux flavonoïdes (AlCl<sub>3</sub>, NH<sub>3</sub>) ; aux coumarines (KOH, NH<sub>3</sub>) et aux alcaloïdes (réactif de Dragendorff).

### 1.1.3. Carte phénolique sur papier Whattman

Pour cette technique chromatographique, Il s'agit de l'utilisation d'une surface plane de cellulose considérée comme support maintenant par imprégnation, une phase stationnaire liquide. Les systèmes de solvants les plus utilisés sont le n-butanol/acide acétique/eau (BAW) : 4 / 1 / 5 (système organique) et Acide acétique 15% (système aqueux). Les résultats obtenus pour les deux extraits sont illustrés par la (figure 5.1).

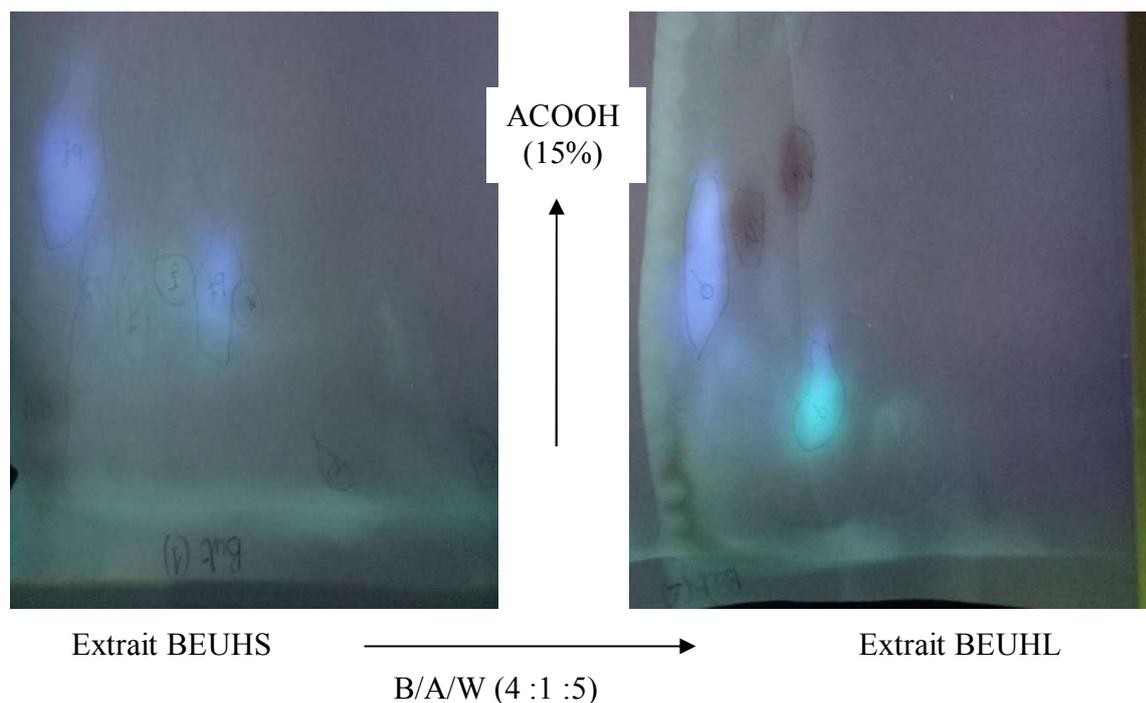


Figure 5.1 : Carte phénolique des extraits BEUHL et BEUHS

La répartition des composés polyphénoliques en chromatographie de partage dépend plus du nombre de groupements hydroxyles portés par le squelette phénolique contenus dans la molécule. On observe, sur les chromatogrammes des deux extraits (Figure 5.1), des composés de polarité très différente. En effet, les deux chromatogrammes montrent, dans la première dimension (système organique) une migration moyenne ou même faible de l'ensemble des composés présent. Alors que dans la deuxième dimension (système aqueux), les composés ont bien migrés du moins polaire pour ceux qui ont été plus retenus par la phase stationnaire, au plus polaire pour ceux qui ont plus d'affinité pour la phase aqueuse acidifiée. Ces constatations permettent de déduire que la majorité des composés présents dans les deux extraits comportent un nombre important de groupements hydroxyles dans leurs structures.

La fluorescence sous la lumière de Wood ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ), pour presque la majorité des composés révélés, supposent la présence des squelettes flavonique de type flavone (coloration noire violet), flavonol (coloration jaune) et d'autres acides phénoliques comportant plusieurs groupements hydroxyles tels que les coumarines, les hydroxybenzoïques et les acides cinnamiques (coloration bleu et bleu fluorescent).

### 1.2. Identification et quantification des acides phénoliques et flavonoïdes par HPLC-TOF/MS

Les extraits BEUHS et BEUHL ont été analysés par RP-HPLC couplé à la spectrométrie de masse. L'identification des acides phénoliques individuels a été effectuée sur la base de leurs temps de rétention par rapport à ceux de différents standards.

#### 1.2.1. Analyse RP-HPLC des acides phénoliques et des flavonoïdes des deux extraits BEUHL et BEUHS

Le (tableau 5.3) présente les quantités des acides phénoliques et des flavonoïdes individuels présents dans les deux extraits (BEUHL, BEUHS). Leur identification a été effectuée par comparaison de leurs temps de rétention et de leur spectre de masse avec ceux de différents standards. Huit (8) acides phénoliques et quatre (4) flavonoïdes ont été identifiés à partir de l'extrait BEUHL et également huit (8) acides phénoliques et uniquement (3) flavonoïdes ont été identifiés à partir de l'extrait BEUHS, leur structure sont présentées dans la (figure 5.3).

Tableau 5.3 : Acides phénoliques et flavonoïdes identifiés dans les extraits BEUHL et BEUHS de l'espèce *H. undulatum* par HPLC-TOF/MS.

	t <sub>R</sub> (mn)	Ac. phénol et flavonoïdes (mg/kg de la plante sèche)	
		BEUHL	BEUHS
Acide fumarique	3,19	12,41	26,84
Acide géntisique	4,41	2,01	1,99
Acide chlorogénique	5,47	0,57	0,55
Catéchine	5,77	1,08	ND
Acide 4-hydroxy benzoïque	6,85	2,36	1,08
Acide protocatechuique	7,01	2,50	2,07
Acide caféique	7,65	ND	0,29
Acide vanilique	7,82	1,72	0,89
Acide syringique	8,08	2,12	2,15
Naringénine	10,52	1,56	0,46
Diosmine	10,62	3,72	3,69
Morine	13,02	1,24	1,24
Acide cinnamique	15,16	1,07	ND

Concernant les acides phénoliques de l'extrait BEUHL, on repère au temps t<sub>R</sub>= 3,19 mn, l'acide fumarique qui semble être le plus abondant avec une quantité égale à 12,41 mg/kg de plante, suivi de l'acide protocatéchuique au temps t<sub>R</sub>= 7,01 mn, puis l'acide 4-hydroxybenzoïque au temps t<sub>R</sub>= 6,85 mn, l'acide syringique à t<sub>R</sub>= 8,08 mn et en dernier

l'acide gentisique à  $t_R= 4,41$  mn avec les quantités de 2,50 ; 2,36 ; 2,12 et 2,01 mg/kg de plante. Des faibles taux sont enregistrés pour l'acide vanilique ( $t_R=7,82$ mn) et l'acide cinnamique ( $t_R=15,16$ mn) avec les valeurs de 1,72 mg/kg et 1,07 mg/kg respectivement. Tandis que l'acide chlorogénique présente la quantité la plus faible avec seulement 0,57 mg/Kg à  $t_R= 5,47$  mn.

Dans l'extrait BEUHS, l'acide fumarique repéré au temps de rétention  $t_R= 3,19$  mn semble être le plus abondant avec la quantité la plus importante de 26,84 mg/kg, suivi de l'acide syringique ( $t_R= 8,08$  mn), puis l'acide protocatéchique ( $t_R= 7,01$  mn) et l'acide gentisique ( $t_R= 4,41$  mn) avec les quantités de 2,15 mg/kg 2,07 mg/kg et 1,99 mg/kg respectivement. Les acides 4-hydroxy benzoïque ( $t_R= 6,85$  mn), vanilique ( $t_R= 7,82$  mn) et chlorogénique ( $t_R= 5,47$  mn) sont moins présents (1,08 mg/kg, 0,89 mg/ kg et 0,55mg/kg respectivement). Tandis que l'acide caféique présente la quantité la plus faible avec seulement 0,29 mg/Kg à  $t_R= 7,65$  mn, ce dernier est totalement absent de l'extrait BEUHL.

Concernant les flavonoïdes, la diosmine ( $t_R= 10,62$  mn) présente la plus grande quantité dans les extraits BEUHL et BEUHS avec les valeurs de 3,72 et 3,69 mg/Kg respectivement, suivie de la morine (13,02 mg/Kg) et la naringénine ( $t_R= 10,52$ ) avec des teneurs plus faibles. La catéchine est présente dans l'extrait BEUHL avec une quantité de 1,08 mg/Kg mais elle n'est pas détectée dans l'extrait BEUHS.

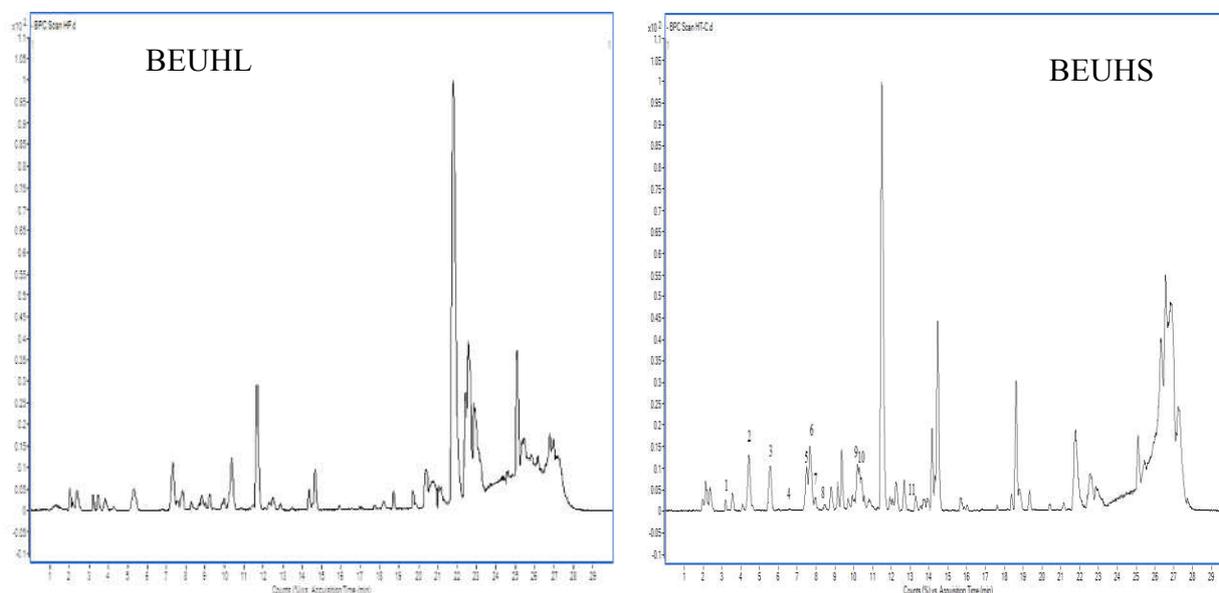


Figure 5.2 : Chromatogramme RP-HPLC des extraits BEUHL et BEUHS

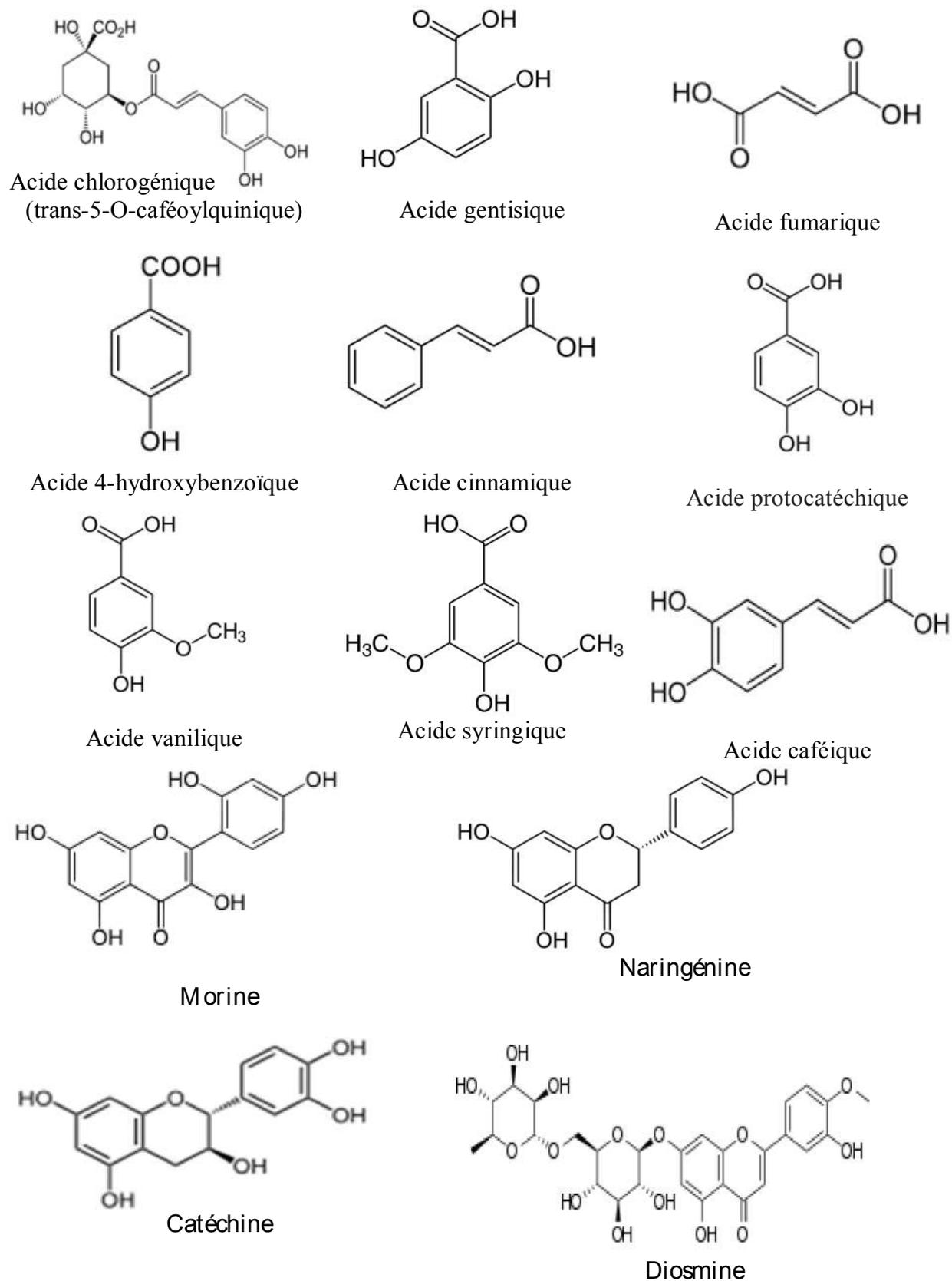


Figure 5.3 : structure des acides phénoliques et des flavonoïdes identifiés dans les extraits BEUHL et BEUHS de l'espèce *H. undulatum*

## 2. Etude Biologique

### 2.1. Evaluation de l'activité antioxdante de la plante H.undulatum

Le corps humain possède un système complexe de défenses anti-oxydant enzymatiques et non enzymatiques qui neutralisent les effets nocifs des radicaux libres et d'autres oxydants. Les radicaux libres sont responsables d'un grand nombre de maladies [1.2.3]. Grâce aux différentes méthodes appliquées ci-dessus, nous avons évalué l'activité antioxydante des deux extraits des tiges (BEHUS) et (BEHUL) des feuilles de la fraction n-BuOH de H.undulatum.

#### 2. 1. 1.Évaluation de l'activité antioxydante in vitro

##### 2. 1. 1.1. Effet scavenger du radical DPPH.

L'analyse par le DPPH est l'une des méthodes les plus connues, elle est précise et fréquemment employée pour évaluer l'activité anti-oxydante [4]. Le DPPH c'est un radical libre stable en raison de sa délocalisation d'électrons sur toute la molécule. La donation de  $H^+$  aux radicaux DPPH a fait un changement qui s'accompagne de passage de la couleur violette à la couleur jaune pâle dans la solution. Le piégeage de DPPH a également fait une diminution proportionnelle de son absorbance à 517 nm (figure 5.4). La (figure 5.5) montre que les deux extraits n-BuOH de la plante H.undulatum inhibent le DPPH° d'une façon dépendante de la dose. L'inhibition maximale du DPPH° ( $79,51 \pm 0,48\%$ ) par l'extrait BEHUL a été observée à une concentration de  $180 \mu\text{g/mL}$  comparativement au BEHUS ( $59,41 \pm 0,67\%$ ) à la même concentration. Les valeurs  $IC_{50}$  également révèlent que l'extrait BEHUL ( $92.72 \mu\text{g/mL}$ ) a un effet scavenger plus important que celui de BEHUS ( $110.80 \mu\text{g/mL}$ ) (figure 5.5).

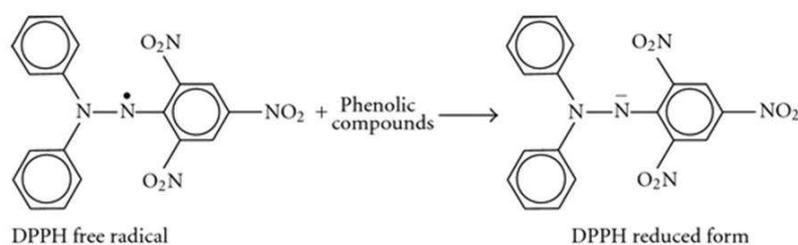


Figure 5.4 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH [4].

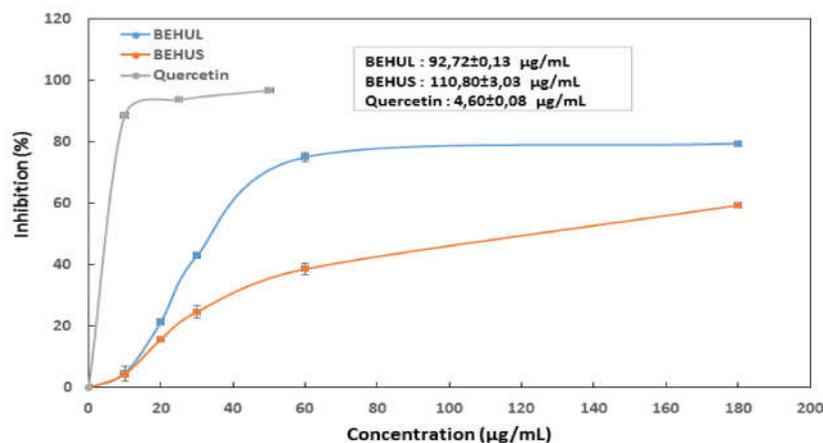


Figure 5.5: L'activité antioxydante des extraits BEHUL et BEHUS et la quercétine vis-à-vis le radical DPPH. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

L'action de piégeage du radical protonique est un des mécanismes qui permet d'expliquer l'activité antioxydante de (BEHUS) et de (BEHUL). Le témoin positif et la quercétine, ont montré un effet de piégeage maximal à très faible concentration (figure 5.5). Les résultats ont montré une importante activité de piégeage de DPPH° des deux extraits n-butanoliques, attribuée probablement à la présence d'une teneur élevée en composés phénoliques confirmé par les études chimique HPLC et CCM. Cette teneur est regroupé en différentes classes tel que les flavonoïdes (naringénine, morin), les acides phénoliques (acide chlorogénique, l'acide caffeique, l'acide cinnamique). Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont générés à partir d'une moléculaire d'oxygène ou d'azote dans la chaîne de transport d'électron (ETC), le cytochrome P450, et d'autres fonctions cellulaire et sub-cellulaires [5]. Un nombre croissant d'études ont été réalisées afin d'évaluer le profil chimique du genre *Heliotropium*, et d'identifier leurs composantes bioactives et d'explorer leurs nouvelles applications. L'activité de piégeage de DPPH° a été également montrée par la fraction n-hexane de l'espèce *H. strigosum* qui avait une valeur  $CE_{50}$  de 35,53  $\mu\text{g/mL}$  [6]. En 2009, Modak a isolé trois types de flavonoïdes, naringénine, 3-O-méthylgalanginane et 7-ométhyléridictiol de la plante *Heliotropium taltalense*; ces flavonoïdes ont présenté une activité antioxydante [6]. Selon l'étude réalisée par Modak et al. [7], la fraction d'acétate de *Heliotropium sinuatum* montrant une activité inhibitrice remarquable du DPPH° pourrait être expliquée par la présence des filifolinol, flavanone et la naringénine et le dérivé de 3-oxo-2-arylbenzofurane. Les études de Murugesu et al. [8] sur les espèces *Heliotropium sclerocarpum*, *Heliotropium zeylanicum*, *Heliotropium glutinosum* ont montré des activités antioxydantes très importantes. Une autre étude *in vitro* par Nori et al. [9] sur deux autres

extraits *H.lasiocarpium* et *H.suaveolens* a montré une présence de l'activité antioxydante et une importante inhibition dose-dépendante du radical DPPH°. Meenatchi *et al.* [10] ont également mentionné une activité antioxydante remarquable de l'extrait éthanolique des feuilles d'*Heliotropium indicum* via le piégeage de DPPH°.

### 2. 1. 1.2. L'activité de piégeage de radical hydroxyl (°OH)

Les résultats de l'activité de piégeage de radical hydroxyl des extraits des BEHUS et BEHUL sont présentés par la (figure 5.6) :

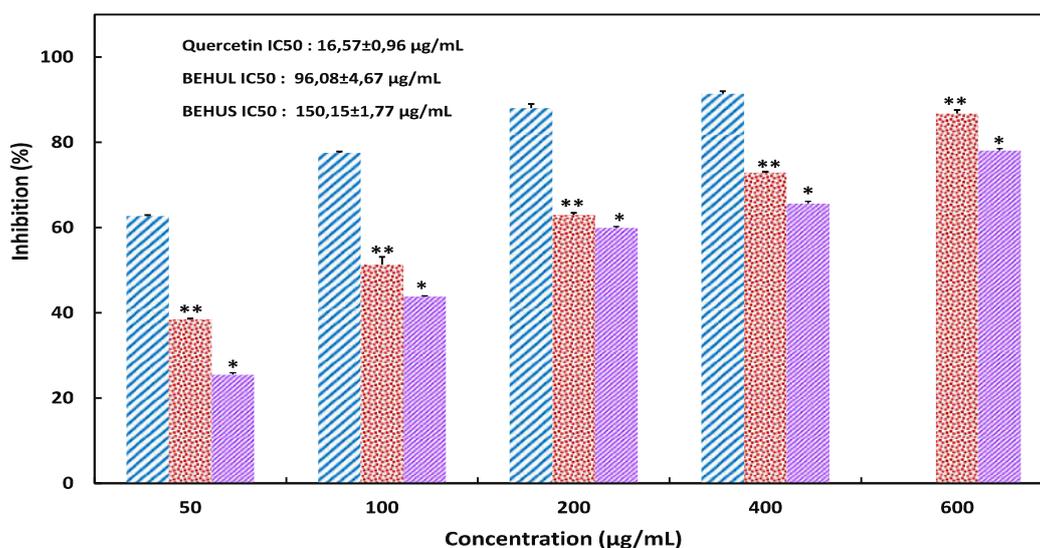


Figure 5.6 : Effet de piégeage de radical hydroxyl des deux extraits BEHUL et BEHUS et la quercétine. Chaque barre représente la moyenne ± SD (n=3).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

D'après la (figure 5.6), les deux extraits BEHUS et BEHUL ont une capacité de piégeage des radicaux libres (OH°) de manière dose-dépendante. Cette capacité inhibitrice est de l'ordre de 59-72% à la gamme de 200-600 µg/mL comparativement à la quercétine qui atteint 91% à 400 µg/mL. L'activité de BEHUL vis-à-vis OH° est plus exprimée par rapport à celle de BEHUS, ceci se traduit par les valeurs IC<sub>50</sub> qui étaient de l'ordre de 96.08 µg/mL et de 150.15 µg/mL, celle de la quercétine est de l'ordre de 16.57 µg/mL. Les radicaux hydroxyles sont des espèces d'oxygène extrêmement réactives qui peuvent réagir avec toutes les molécules possibles dans les organismes vivants, en particulier avec les protéines, l'ADN et les lipides [11]. Les radicaux hydroxyles sont capables d'initier rapidement le processus de peroxydation lipidique en extrayant des atomes d'hydrogène d'acides gras insaturés [12]. Les

capacités de donation d'électrons ou de protons des extraits de *H.undulatum* ont été confirmées par le système de réaction de Fenton d'où les radicaux  $^{\circ}\text{OH}$  sont générés et mesurés par leur capacité à dégrader le désoxyribose dans le fragment qui réagit avec l'acide thiobarbutirique pour former un chromogène rose [13].

### 2. 1. 1. 3. Le pouvoir chélateur ferreux

Le test du pouvoir chélateur du fer mesure la capacité des antioxydants à entrer en compétition chélatrice avec la ferrozine visant l'ion ferreux. La ferrozine peut former un complexe de couleur rouge en formant des chélates avec  $\text{Fe}^{2+}$ . Cette réaction est limitée en présence d'autres agents chélatants et entraîne une diminution de la couleur rouge des complexes ferrozine- $\text{Fe}^{2+}$ . [14]

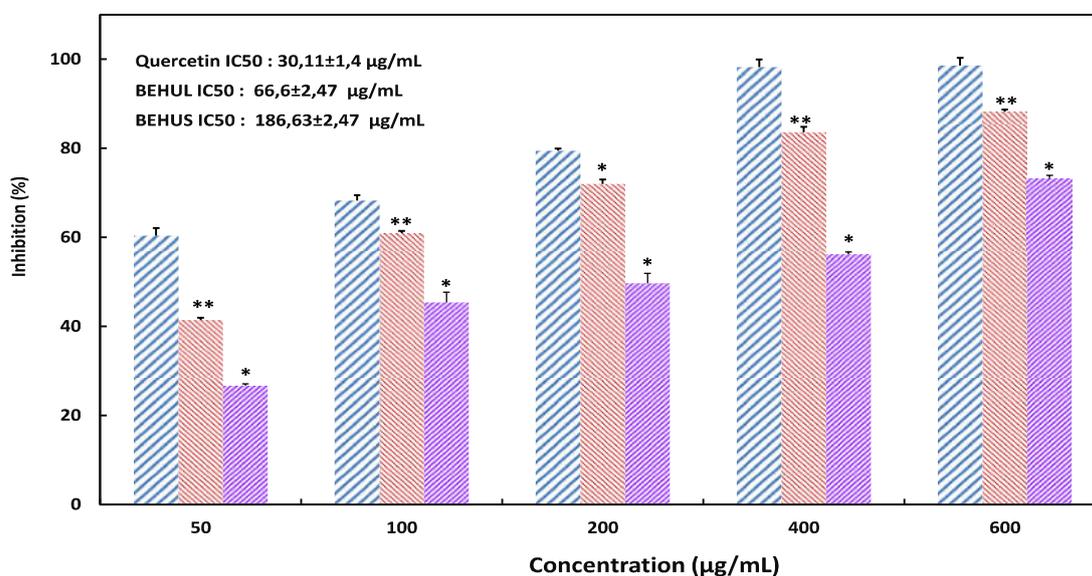
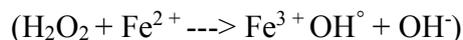


Figure 5.7 : Effet chélateur des deux extraits BEHUS et BEHUL et de la quercétine. Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

La (figure 5.7) montre que la capacité chélatrice de l'extrait BEHUL (88.17 à 600 µg/mL ;  $\text{IC}_{50}$  = 66,6±2,47 µg/mL), accompagnée d'une concentration dépendante, est plus considérable en comparaison avec l'extrait BEHUS (73,18 % ;  $\text{IC}_{50}$  = 186,63±2,47µg/mL). Le pouvoir chélateur dépendant de la présence des principes réducteur paraît en concordance avec le contenu qualitatif et quantitatif de ces fractions décrit dans le (tableau 5.3) et la (figure 5.2). Les ions ferreux sont l'un des pro-oxydants les plus efficaces, leurs interactions avec le peroxyde d'hydrogène dans les systèmes biologiques peut conduire à la formation de radicaux

hydroxyles hautement réactifs. Les ions métalliques de transition, en particulier le fer, peuvent stimuler les lipides par oxydation de Fenton par la réaction suivante :



Ils peuvent également altérer les lipides par oxydation en décomposant les lipides hydro-électriques en radicaux peroxy et alcoxy qui peuvent perpétuer la réaction de Fenton en chaîne [15,16]. Il a été signalé que les agents chélateurs qui forment une liaison de type  $\sigma$  avec les métaux sont actifs comme antioxydants secondaires car ils diminuent le potentiel redox et stabilisent la forme oxydée de l'ion métallique [17]. Une étude menée sur l'extrait aqueux de *H. indicum* indique que l'activité de chélation du fer a été largement importante ( $IC_{50} = 58.24 \mu g/mL$ ) [18]. Une autre étude menée par d'Abdlaaty [19] a mentionné que la capacité de chélation du fer des extraits *H. ramosissimum* a atteint 100% à une concentration de 40 mg/mL.

### 2. 1. 1. 4. Le pouvoir réducteur du Fer

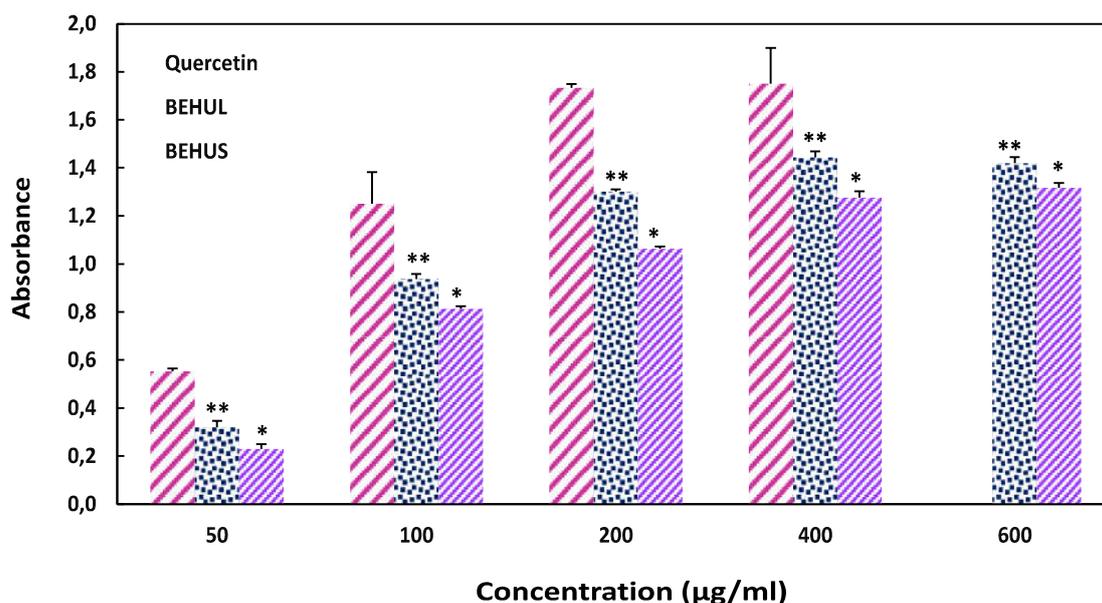


Figure 5.8 : Pouvoir réducteur des extraits BEHUS et BEHUL et la quercetine. Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

L'évaluation de la puissance réductrice est utilisée pour estimer la capacité d'un antioxydant à donner un électron; ceci est un mécanisme important montrant l'action

antioxydante des composés bioactifs [20,21]. La (figure 5.8) montre les activités réductrices d'extraits butanolique des feuilles et tiges de *H.undulatum* en comparaison avec la quercétine. Plus l'absorbance du mélange réactionnel est élevée, plus la puissance réductrice est élevée. Le pouvoir réducteur trouvé est dans l'ordre de quercétine > feuilles > tiges. À 600ug/mL la densité optique de l'extrait BEHUL est égale à  $1,42 \pm 0,03$ , celle de l'extrait BEHUS est égale à  $DO=1,32 \pm 0,02$ ; ce qui indique que le pouvoir de réduire l'ion ferricyanide ferrique est mieux prononcée par l'extrait BEHUL. Il a été rapporté que le pouvoir réducteur des substances est probablement dû à leur capacité de donner de l'hydrogène [22]. L'extrait des feuilles de l'*H.undulatum* pourrait donc contenir une quantité élevée des réducteurs comparativement à l'extrait des tiges. Ceci pourrait être corrélé à sa teneur élevée en naringenine, diosmine, morine. Plusieurs auteurs ont rapportés que les extraits de genre *Heliotropium* tels que l'espèce *H. indicum* Linn [23] possèdent des propriétés réductrices corrélées aux taux des phénols totaux, expliquant ainsi leur rôle antioxydant [24,25].

On conclusion :

*L'activité antioxydante prouvée est manifesté par une grande variété d'action, telle, l'activité de piégeage de radical DPPH, l'activité de piégeage de radical hydroxyl ( $^{\circ}OH$ ), la chélation des métaux de transition, ainsi que le pouvoir réducteur. Ceci indique que les métabolites secondaires dont les plus intéressants sont les polyphénols contribuent en grande partie aux activités antioxydantes de l'espèce *Heliotropium undulaum* notamment la fraction feuilles et pourraient donc jouer un rôle très important dans les effets bénéfiques de cette plante médicinale.*

## 2. 1. 2.Évaluation de l'activité antioxydante invivo

### 2. 1. 2.1. Evaluation de l'activité antioxydante in vivo et hépatoprotective

#### 2. 1. 2.1.1. Marqueurs de l'hépatotoxicité

-Les transaminases et de la phosphatase alcaline

L'activité des transaminases ALT et AST sériques a augmenté de manière significative chez le groupe traité par l'hydrazine (300 mg/kg) par rapport au groupe témoin. L'administration de l'extrait BEHUL (200 mg/kg) corrige l'effet de l'hydrazine et normalise les valeurs des ALT à 72.1 % et à AST 81.5 %. Ces valeurs pourraient être considérées comme comparables à celles de la vitamine E qui a réduit l'augmentation des ALT et AST à (82,93 et 86, 66% respectivement) (figure 5.9). L'extrait BEHUS (68.7 ,75.67 %) semble moins efficace.

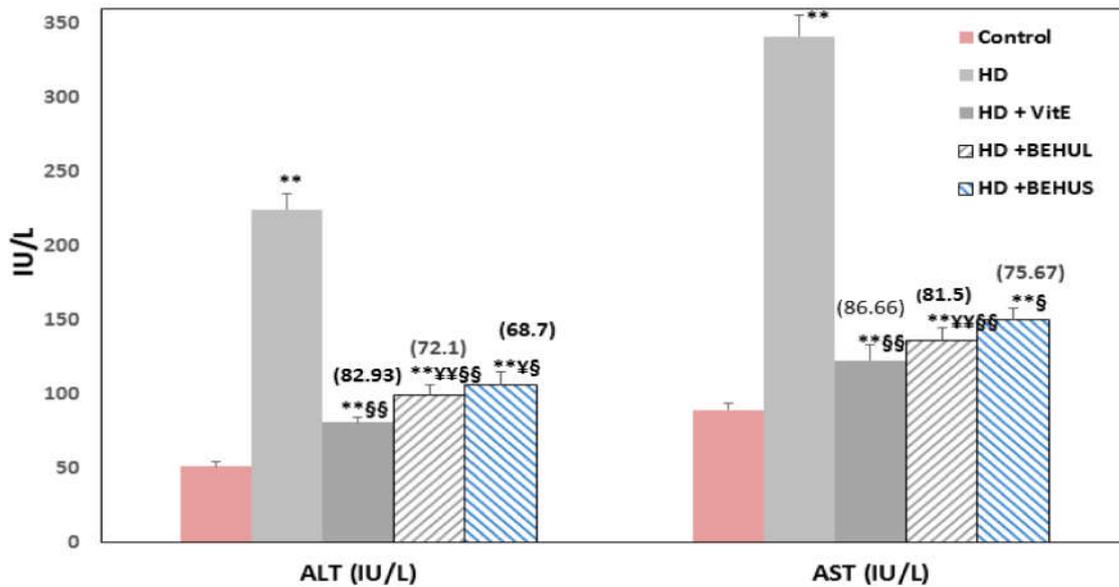


Figure 5.9 : L'effet protecteur des deux extraits BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et de la vitamine E sur le niveau sérique des enzymes ALT et AST dans le foie des rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg). Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=5).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

¥¥ : comparaison avec le BEHUL (¥p < 0.05, ¥¥p < 0.01).

§§ : comparaison avec le BEHUS (§p < 0.05, §§p < 0.01).

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

Les valeurs entre parenthèses : % de protection

## - La bilirubine totale et l'ALP

Une augmentation significative au niveau de la bilirubine totale a été enregistrée chez les rats traités par l'hydrazine. D'une manière générale l'administration des rats par une dose de (200 mg/kg) de l'extrait n-BuOH temporelise l'effet de l'hydrazine et normalise le niveau de la bilirubine totale. En outre, le groupe traité par BEHUL a montré un résultat très intéressant (76.92%) par rapport au groupe traité par l'extrait BEHUS (51.02 %). L'effet protecteur était plus efficace chez le groupe traité avec la vitamine E en diminuant la concentration de la bilirubine jusqu'à 89.74 % (Figure 5.10). Le taux élevé de la phosphatase alcaline a été observé après administration de l'hydrazine, le prétraitement par l'extrait BEHU à diminuer d'une façon significative le taux élevé de la phosphatase alcaline (77.56%) par rapport au groupe traité par l'extrait BEHUS (58.99%).

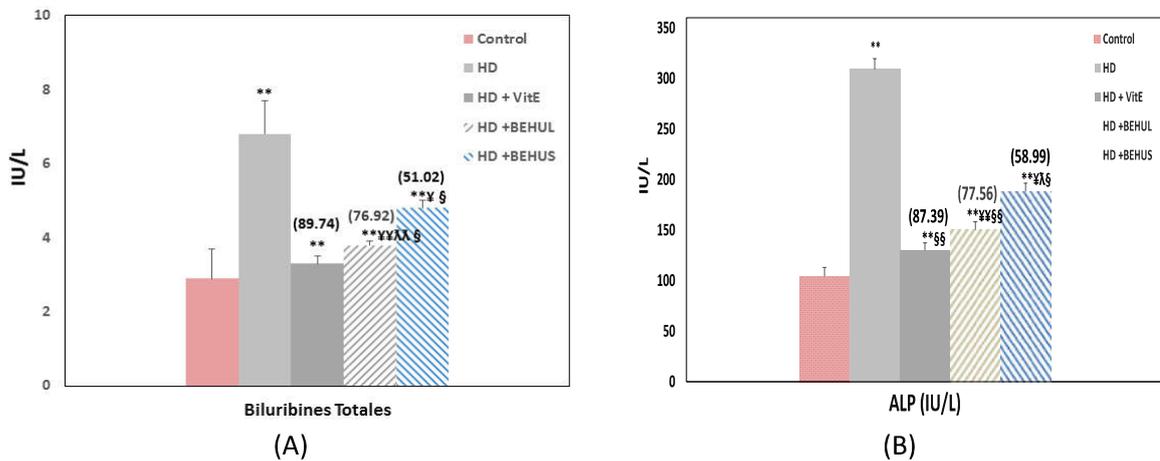


Figure 5.10 : L'effet protecteur de BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et de la vitamine E sur le niveau sérique des enzymes ALP et bilirubine totale dans le foie des rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg).

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=5).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

¥¥ : comparaison avec le BEHUL (¥p < 0.05, ¥¥p < 0.01).

§§ : comparaison avec le BEHUS (§p < 0.05, §§p < 0.01).

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

Les valeurs entre parenthèses : % de protection

## 2. 1. 2.1.2. Evaluation du statut oxydatif cytosolique

### 2. 1. 2.1.2.1. Peroxydation lipidique (MDA)

La peroxydation lipidique des membranes biologiques est parmi les principaux effets dégénératifs des radicaux libres [26]. La (figure 5.11) montre que l'hépatotoxicité induite par l'HD a provoqué une peroxydation lipidique traduite par une augmentation hautement significative du taux du MDA (TBARS) ( $95,8 \pm 4,3 \mu\text{mol/mg}$  protéine). Le pré-traitement des rats avec l'extrait BEHUL (200 mg/kg) par voie orale a significativement diminué les taux de MDA (75.22 %) en comparaison au BEHUS (57.52 %).

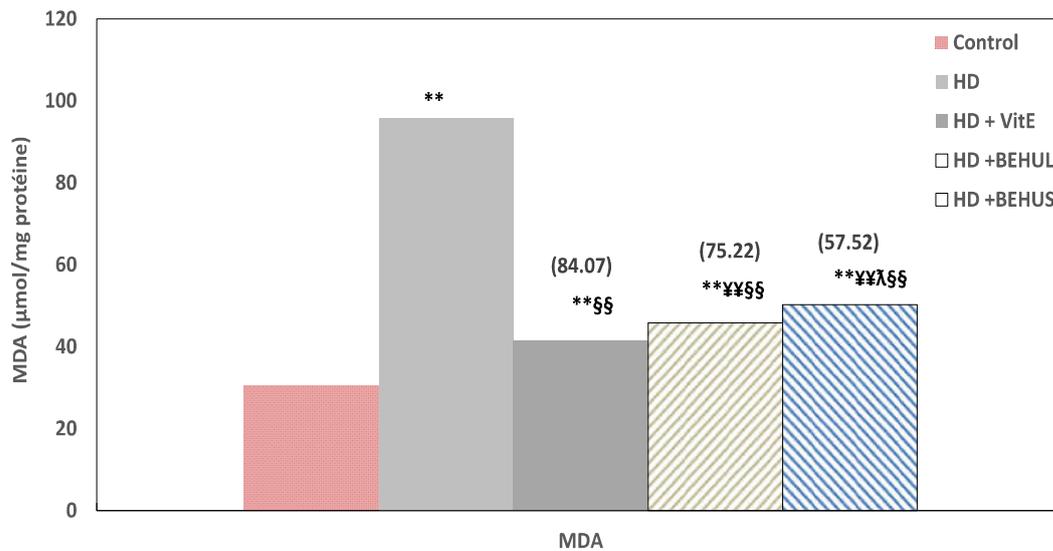


Figure 5.11 : L'effet protecteur des deux extraits BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et de la vitamine E sur le taux de MDA chez les rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

¥¥ : comparaison avec le BEHUL (¥ $p < 0.05$ , ¥¥ $p < 0.01$ ).

§§ : comparaison avec le BEHUS (§ $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$ ).

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

Les valeurs entre parenthèses : % de protection

### - L'activité des enzymes anti-oxydantes

Les enzymes anti-oxydantes sont considérées comme la première ligne de défense cellulaire qui protège les composants cellulaires contre les dommages oxydatifs. Tels que SOD, CAT et GPx sont des enzymes importantes dans l'élimination des espèces réactives de l'oxygène [27].

## 2. 1. 2.1.2.2. L'activité enzymatique de SOD et CAT cytosolique

L'activité enzymatique de la CAT et de la SOD dans le foie des rats recevant l'hydrazine (300 mg/kg) a significativement diminuée ( $P < 0.01$ ) par rapport aux témoins. Il y avait une augmentation significative de l'activité de la SOD et CAT dans les groupes pré-traité avec les extraits BEHUL et BEHUS de *H.undulatum* qui sont respectivement (79.15 et 71.28 %) et (65.17 et 58.5 %). La vitamine E a préservé l'activité de la SOD cytosolique jusqu'à (85.5 %) et celle de la CAT cytosolique jusqu'à (89.81 %) (Figure 5.12).

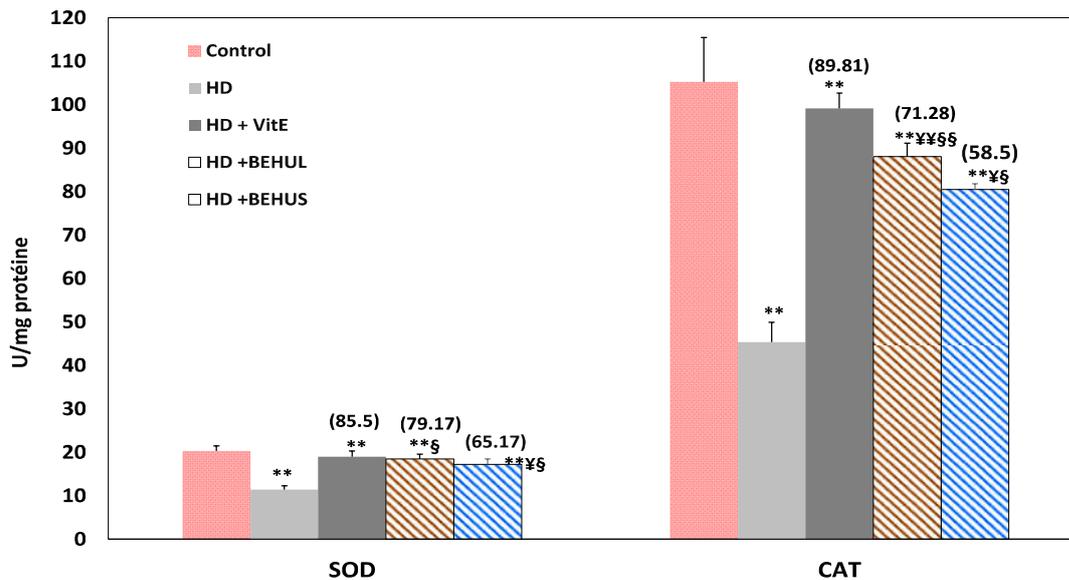


Figure 5.12 : L'effet protecteur des extraits BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et de la vitamine E sur le niveau sérique des enzymes de SOD et CAT dans le foie des rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

¥¥ : comparaison avec le BEHUL (¥ $p < 0.05$ , ¥¥ $p < 0.01$ ).

§§ : comparaison avec le BEHUS (§ $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$ ).

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

Les valeurs entre parenthèses : % de protection

## 2. 1. 2.1.2. 3. L'Activité enzymatique de système glutathion cytosolique

Le traitement des rats par l'hydrazine a engendré clairement une déplétion du taux de GSH hépatique et un épuisement des valeurs de l'activité des enzymes liées au système glutathion à savoir la GST, la GR et la GPx (figure 5.13 et 5.14). Le prétraitement des rats avec l'extrait BEHUL (200 mg/kg) a rétabli d'une façon efficace le taux du GSH (79.62 %)

et a mieux récupérées les activités des enzymes du système-glutathion, la GPx (72.91 %), la GST (75.67 %) (Figure 5.13 et 5.14) et la GR (79.16 %) en comparaison avec le BEHUS : GSH (66.66 %), GPx (57.29 %), GST 56.75 %), GR (64.58 %) (Figure 5.13 et 5.14). La récupération des paramètres de ce système antioxydant par l'extrait BEHUL (200 mg/kg) est comparable à celle notée dans le cas du traitement des rats par la vitamine E : GSH (86.41 %), GPx (84.37 %), GST (86.54 %) et GR (83.33 %) (Figure 5.13 et 5.14).

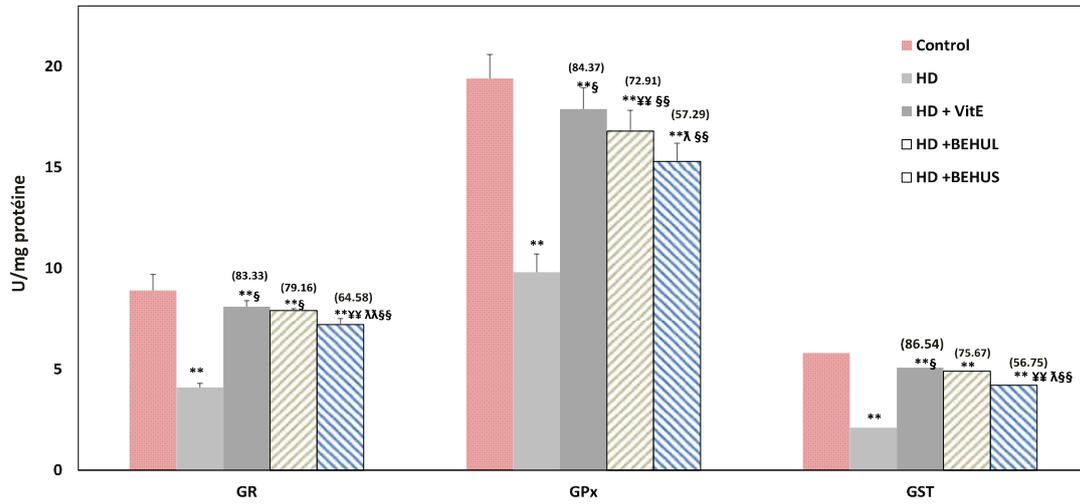


Figure 5.13 : L'effet protecteur des extraits BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et de la vitamine E sur le système glutathion cytosolique dans le foie chez des rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

¥¥ : comparaison avec le BEHUL (¥p < 0.05, ¥¥p < 0.01).

§§ : comparaison avec le BEHUS (§p < 0.05, §§p < 0.01).

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

Les valeurs entre parenthèses : % de protection

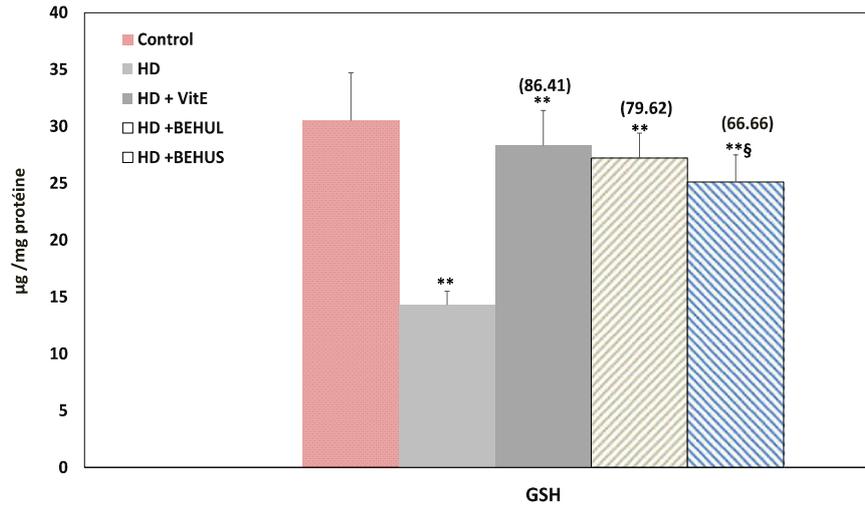


Figure 5.14 : L'effet protecteur des BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et de la vitamine E sur le système glutathion cytosolique dans le foie chez des rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg). \*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

¥¥ : comparaison avec le BEHUL (¥p < 0.05, ¥¥p < 0.01).

§§ : comparaison avec le BEHUS (§p < 0.05, §§p < 0.01).

Chaque barre représente la moyenne ± SD (n=3).

Les valeurs entre parenthèses : % de protection.

Plusieurs mécanismes sont été proposés pour expliquer le métabolisme de l'hydrazine par l'hépatocytes [28]. L'hydrazine en tant qu'agent réducteur puissant n'est pas facilement excrété après sa pénétration dans l'organisme, il est métabolisé en métabolites toxiques et radicaux libres qui endommagent le foie et aboutit à une réduction de la viabilité cellulaire [29,30,31,32]. Avec son groupe amino libre il est capable de réagir avec les alpha-céto-acides endogènes et d'induire une variété d'effets néfastes sur la santé. Les études *in vivo* et *in vitro* indiquent que l'hydrazine est métabolisé par plusieurs voies, à la fois enzymatique et non enzymatique, [33,34]. Plusieurs études ont utilisé les microsomes hépatiques, où l'hydrazine est oxydée par le cytochrome P-450 pour produire un agent acylant réactif [35]. Les résultats de la présente étude ont clairement démontré une corrélation entre l'administration de l'hydrazine (300mg/kg) et l'activité des transaminases sériques (AST et ALT), l'ALP et la bilirubine dans le sérum. La fuite des grandes quantités d'enzymes dans le courant sanguin reflète la gravité de l'atteinte hépatocytaire [36,37]. Une bilirubinémie a été enregistrée également chez le group-hydrazine. Il est bien connu que les agents nécosants comme l'hydrazine provoque des blessures suffisantes dans le parenchyme hépatique ce qui conduit à une augmentation importante de la teneur en bilirubine [38]. Le taux élevé de la phosphatase

alcaline pourrait être dû à sa synthèse accrue par les canalicules biliaires en réponse à la pression biliaire augmentée et à la cholestase [39]. Cependant, le rétablissement de niveau de ces paramètres a été significativement remarquable après l'administration orale des deux extraits n-BuOH de la plante *H.undulatum* à (200mg/kg), BEHUS et BEHUL, ce qui indique que les extraits n-BuOH de la plante *H.undulatum* empêché les lésions du foie. Ces résultats indiquent clairement que l'extrait BEHUL est mieux placé pour donner une protection importante en stabilisant la membrane cellulaire vis-à-vis les lésions hépatiques induites par l'hydrazine d'une manière comparable à celle de la vitamine E.

Plusieurs études ont mis en évidence un stress oxydant au cours d'une lésion hépatique induite par l'hydrazine, notamment une élévation de la peroxydation lipidiques et un déséquilibre dans le système de défense antioxydant enzymatique et non enzymatique [37,40]. L'accumulation des dérivés de radicaux libres sont capables d'épuiser l'activité de système enzymatique des cellules ; ils sont responsables des dommages de la membrane cellulaire et la libération consécutive des enzymes de marqueurs d'hépatotoxicité [41]. Ces radicaux libres favorisent également l'oxydation des AG insaturés des phospholipides membranaires dans les hépatocytes conduisant à une peroxydation des lipides qui génère à la formation des dérivés aldéhydiques nuisibles modifiant la structure cellulaire et conduisant à la mort cellulaire par nécrose [42]. Les antioxydants au sens large sont toutes substances susceptibles d'inhiber directement la production, la propagation ou la destruction des ERO [43]. Parmi les systèmes antioxydants enzymatiques cellulaires figurent en première ligne la SOD et la CAT. La réduction d'activité de ces enzymes est le résultat d'une production excessive ou incontrôlée des ERO [41]. Dans notre présente étude, une réduction significative de l'activité cytosolique des enzymes tels la CAT et la SOD chez les rats recevant l'hydrazine a été enregistrée.

La SOD est la principale enzyme antioxydante qui catalyse la conversion de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ ) et protège les cellules et les tissus des ERO provenant de sources endogènes et exogènes [44]. La CAT est une enzyme présente en grande partie dans des organites subcellulaires tels que les peroxysomes, elle protège la cellule contre les dommages oxydatifs par le  $H_2O_2$  et  $^{\circ}OH$  [45]. Une réduction significative de l'activité cytosolique de ces enzymes chez le rat traité par l'hydrazine reflète l'atteinte hépatique ; seulement le pré-traitement avec les extraits n-butanol de *H. undulatum* a montré une augmentation significative du niveau de ces enzymes, ce qui pourrait être leurs activités antioxydantes contre les radicaux libres tels l'acétyle, l'hydroxyle. En accord à ce qui est fréquemment décrit chez les patients ou chez les rats atteints d'une hépatotoxicité induite par l'hydrazine nous avons enregistré 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'hydrazine. D'une manière générale l'hydrazine induit de façon significative l'épuisement du GSH dans le foie et provoque un déséquilibre de GSH/GSSH qui est le résultat d'une diminution de l'activité du GR [46]. La réduction de ce système favorise les radicaux libres à s'accumuler et pourrait stimuler d'avantage le processus de peroxydation lipidique et donc d'augmenter la teneur en malondialdéhyde [47].

Le GSH est un élément clé dans la détection d'une toxicité accrue aux xenobiotiques, y compris l'hydrazine [48]. Il est largement réparti entre les cellules vivantes, agissant comme un agent réducteur intracellulaire essentiel dans le maintien du statut redox intracellulaire [46]. Il est également considéré comme la biomolécule la plus importante pour la protection contre la cytotoxicité, en participant à l'élimination des intermédiaires réactifs par conjugaison et à la réduction des hydroperoxydes ou de radicaux libres par action directe [40].

Des études *in vitro* réalisées au niveau des hépatocytes de rat indiquent que la cytotoxicité aiguë provoquée par l'hydrazine est principalement médiée par l'induction du stress oxydatif dû à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'épuisement du glutathion réduit. Le GSH est consommée par de nombreuses façons, telle l'oxydation, la conjugaison et l'hydrolyse [29].

La GPx appartient à une classe d'enzymes qui catalysent la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'hydroperoxyde de phospholipide et d'autres hydroperoxydes organiques ; elle supprime le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en couplant sa réduction avec l'oxydation du glutathion réduit. La GPx peut également réduire d'autres peroxydes tels que les hydroperoxydes d'acides gras [44].

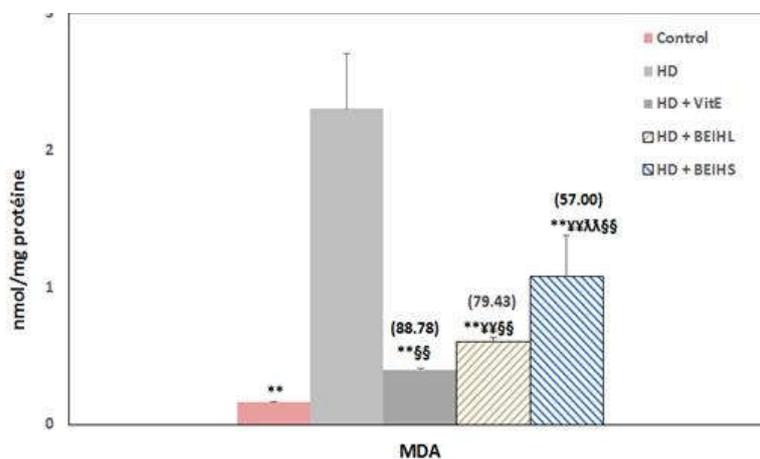
Le pré-traitement des rats par les extraits de la plante *H.undulatum* à (200 mg/kg), BEHUS et BEHUL à 200 mg/kg a empêché la diminution du GSH et a permis de corriger la réduction d'activité du système enzymatique dépendant du de glutathion observées chez les rats recevant l'hydrazine.

Nos résultats *in vivo* sont en forte accord avec nos résultats *in vitro*, ils indiquent que l'effet hépatoprotecteur de tiges et des feuilles de l'extrait de *H.undulatum* peut être dû à la présence des phyto-constituants (flavonoïdes, coumarines, alcaloïdes et les acides phénoliques). L'activité de piégeage des radicaux libres *in vitro* de *H. undulatum* suggère la possibilité de l'extrait de *H.undulatum* de réduire le stress oxydatif cytosolique. Dans cette étude l'extrait BEHUL à (200 mg/kg) est le plus marquant comparativement à la fraction BEHUS ; cet effet est proportionnel à la nature qualitative et quantitative de ces deux fractions. L'extrait BEHUL renferme les flavonoïdes tels la morine, la diosmine et la naringine ainsi que les acides phénoliques tel que l'acide vanilique et l'acide syringique. Avec

leurs effets synergiques ils peuvent arrêter la lésion hépatique aigue en agissant comme piègeurs de radicaux libres

### 2. 1. 2.1. 3. Evaluation du statut oxydant mitochondrial

Le statut oxydatif mitochondrial a été évalué au niveau des mitochondries isolée du foie des rats pré-traités par les extraits n-BuOH (200 mg/kg) de *l'Heliotropium* (BEHUL / BEHUS) et par l'hydrazine (300 mg/kg). Les rats traités par l'hydrazine ont manifesté 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 pré-traitement des rats avec les deux extraits BEHUL et BEHUS a réduit d'une manière significative le taux du MDA à 79.43 % et à 57% respectivement (figure 5.15 A) ; il a aussi corrigé les activités des enzymes du système antioxydant, la SOD à 74.36 % et à 50 % respectivement, la GPx à 71.72 % et à 66.2 % respectivement (figures 5.15 B et C). Ces deux extrait ont également rétablit le taux de GSH à 71.42 % et à 56.89 % respectivement (figure 5.15 D). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par le co-traitement des rats avec la vitamine E : GSH (82.85 %), GPx (86.2 %), SOD (81.33 %) et MDA (88.78 %) (figures 5.15 A, B, C et D).



(A)

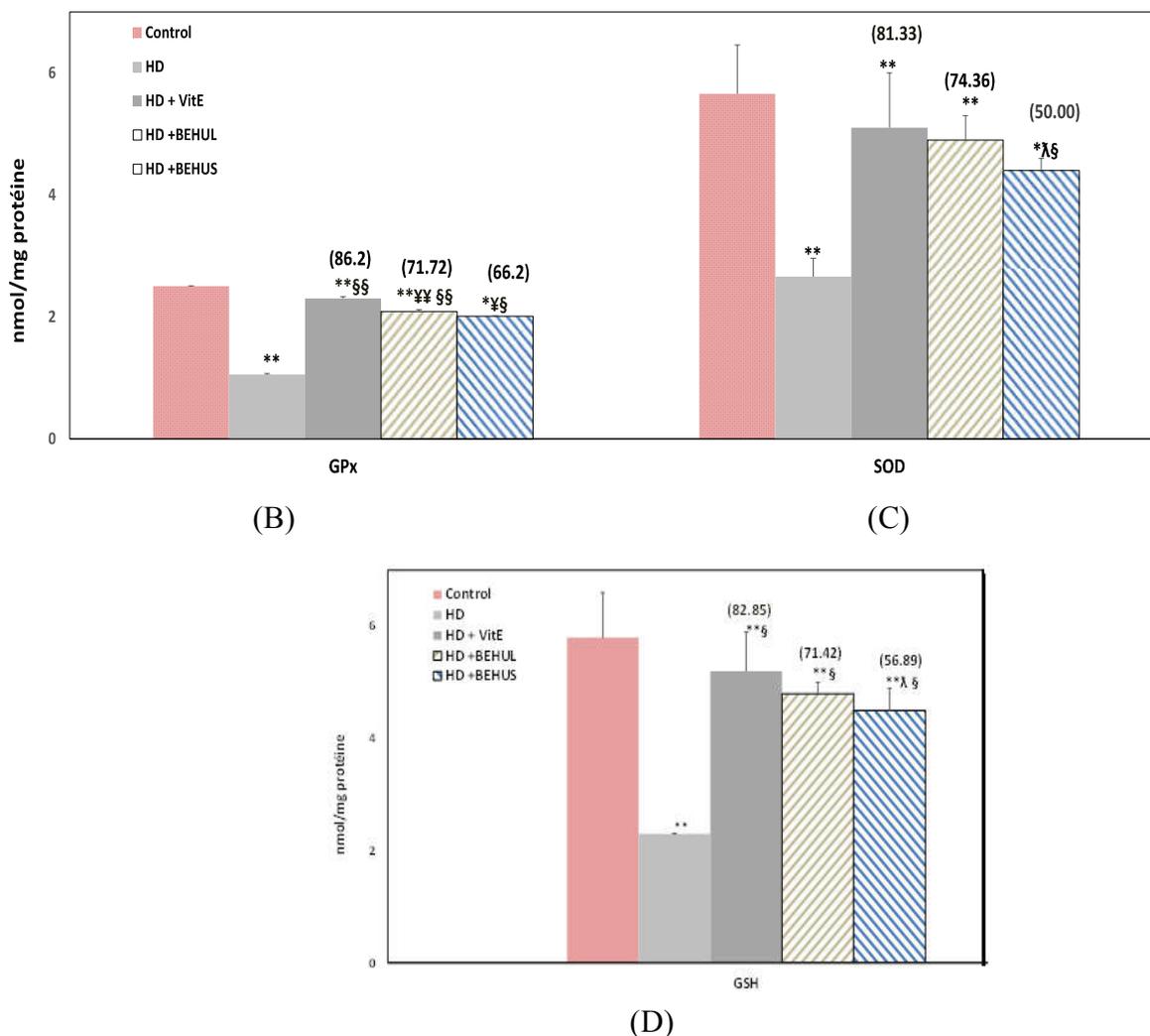


Figure 5.15 : L'effet des deux extraits BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) et la vitamine E sur la variation des taux des enzymes antioxydants mitochondriale et de MDA des hépatocytes chez les rats traités par l'hydrazine (300 mg/kg).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

¥¥ : comparaison avec le BEHUL (¥p < 0.05, ¥¥p < 0.01).

§§ : comparaison avec le BEHUS (§p < 0.05, §§p < 0.01).

Chaque barre représente la moyenne ± SD (n=6).

Les valeurs entre parenthèses : % de protection

Afin de mieux cerner la conception des mécanismes liés à l'hepatotoxicité induite par l'hydrazine nous nous sommes intéressées au rôle du dysfonctionnement mitochondrial et sa probable interaction avec des deux extraits butanoliques BEHUS et BEHUL de *H.undulatum*. Les mitochondries sont des cibles vulnérables pour les lésions toxiques en raison de leur rôle crucial dans le maintien de la structure cellulaire et la production d'ATP aérobie [50]. Les dommages mitochondriaux peuvent à leur tour renforcer le stress oxydatif

[36]. La membrane mitochondriale, principale source intracellulaire d'ERO, est-elle même sensible à l'action de ces radicaux, d'où la fonction mitochondriale peut être altérée [50]. Les résultats obtenus, montrent que les mitochondries isolés des rats traités par l'hydrazine souffrent d'un stress oxydatif se manifestant par une altération de taux des Mn-SOD, GSH et GPx mitochondriales. A ce niveau, l'hydrazine a augmenté le taux de du superoxyde mitochondrial et a réduit l'expression protéique de la Mn-SOD responsable de l'élimination [51]. De même la diminution des taux de Mn-SOD pourrait être due à sa nitration par les ERO généré par l'hydrazine.

D'autre part une concentration plus élevée de l'hydrazine ou de ses métabolites conduit à l'épuisement du GSH [36, 51, 52]. La déplétion de l'activité du GSH pourrait avoir comme transite une production des radicaux, y compris des radicaux méthyles, acétyle, hydroxyle et hydrogène, qui ont été observées au cours du métabolisme de HD [53]. Lors de l'évaluation du stress oxydatif mitochondrial qui a été effectuée au niveau des mitochondries du foie des rats traités par l'hydrazine, 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 [43].

Il a été rapporté que l'exposition à l'HD entraîne une déplétion de l'adénosine triphosphate (ATP) accompagnée par la formation des mégamitochondries *in vivo* [51] et inhibition de la succinate déshydrogénase mitochondriale, ce qui réduit la fonction mitochondriale. En outre, le HD provoque une toxicité en interférant avec un certain nombre de processus métaboliques tels que la gluconéogenèse et la glutamine synthétase [54]. De nombreux travaux ont montré que le potentiel membranaire mitochondrial est réduit avec une concentration croissante de HD. Il a été suggéré que l'arrêt de la fonction mitochondriale dans des conditions de stress oxydatif peut induire une apoptose à des concentrations d'exposition qui ne conduisent pas directement à la cyto-létalité [55]. Des expériences réalisées par Kang Kwang *et al.* [56] ont révélé que l'hydrazine inhibe l'activité du complexe II dans les mitochondries de levure isolées, ainsi que dans les mitochondries mammaliennes; ainsi un stress mitochondrial est associé. Les auteurs de cette étude suggèrent que l'hydrazine pourrait inhiber sévèrement le flux d'électrons mitochondrial proximal en bloquant conjointement la réduction de l'ubiquinone [56]. Il est intéressant de noter que les extrait BEHUL et BEHUS ont réussi a protégé les mitochondries en préservant le taux des Mn-SOD, GSH et GPx mitochondriales. Celle-ci peut être associée à l'effet antioxydant des composés bioactifs contenus dans ces extraits caractérisés par leurs capacités de restaurer le

dysfonctionnement mitochondrial en assurant une protection du statut redox intra-mitochondrial via les propriétés révélée lors de notre étude invitro.

## 2. 1. 2.1. 3. Evaluation du dysfonctionnement microsomal

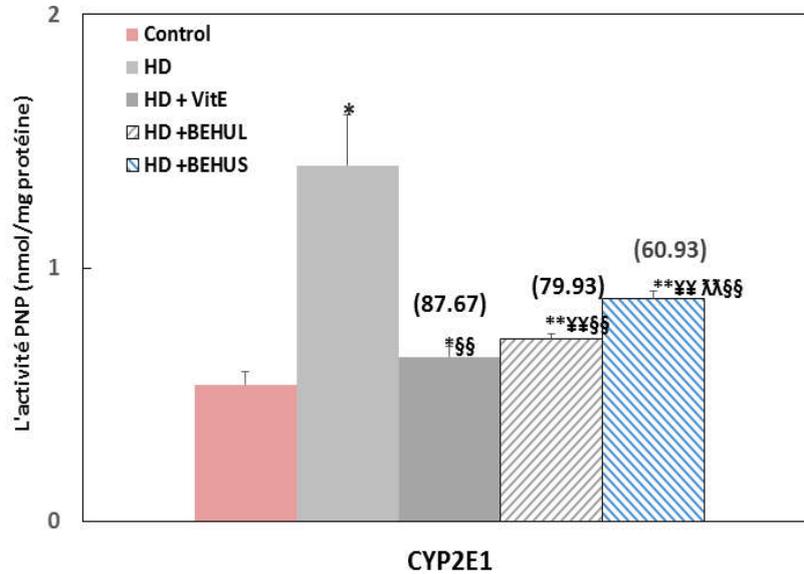


Figure 5.16 : Effet des deux extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) et la vitamine E sur l'oxydation du PNP chez des rats traités par HD (300mg/kg).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

¥¥ : comparaison avec le BEHUL (¥p < 0.05, ¥¥p < 0.01).

§§ : comparaison avec le BEHUS (§p < 0.05, §§p < 0.01).

Chaque barre représente la moyenne ± SD (n=6).

Les valeurs entre parenthèses : % de protection

La (figure 5.16) montre l'effet des extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) sur l'oxydation du PNP chez des rats traités par l'hydrazine (300mg/kg). A partir de ces resultats on observe que le traitement des rats par l'hydrazine a augmenté significativement (P <0,01) l'oxydation du PNP p-nitrocatécholde l'ordre de (3,85 fois), c'est une induction nette du CYP2E1. Inversement, les taux d'oxydation du PNP étaient significativement (P <0,01) plus faibles chez les rats recevant les extraits BEHUL (79,93%), BEHUS (60.93) ou la vitamine E (87.67%) (Figure 5.16). Il a été suggéré que l'activation métabolique de l'hydrazine conduit à une toxicité d'où divers systèmes enzymatiques tels que le CYP1A1, CYP1A2 et CYP2E1 sont été impliqués [57]. Selon la littérature, l'hydrazine est oxydée par le cytochrome P450

pour former des intermédiaires hépatotoxiques qui se lient aux macromolécules cellulaires. [58,59] Le système CYP450 microsomal hépatique, principalement CYP2E1, est considéré comme un acteur central dans la voie de la génération ERO, d'une manière directe ou indirecte [60,61]. L'exposition des humains ou d'animaux à l'hydrazine est exprimée par des réactions d'oxydation catalysées par le cytochrome P450 / FMO (flavine contenant la monooxygénase). [58,62]. Le métabolisme de l'hydrazine par le CYP2E1 génère des intermédiaires toxiques et des quantités excessives de ERO [63,64,65,66,67]. La formation de radicaux libres au cours de l'oxydation microsomique de l'hydrazine a conduit à l'hypothèse que les radicaux libres sont impliqués dans l'hépatotoxicité des dérivés de l'hydrazine [62,68]. Dans notre étude, une diminution marquée du niveau de CYP2E1 a été enregistrée chez les rats traités par l'extrait BEHUL, ceci est probablement dû aux composés bioactifs présents dans cet extrait. Les effets protecteurs du polyphénol par l'inhibition des isozymes du CYP450 ont été rapportés par plusieurs études. Ho *et al.* [69] ont signalé l'inhibition de l'activité du CYP3A4 humain par des flavonoïdes de pamplemousse, Brantley *et al.* [70] ont indiqués que les deux types de flavonolignanes isolés à partir du chardon-Marie (*Silybum maria-num*) sont considérés comme inhibiteur du CYP2C9, Gurley *et al.* [71] ont révélés que la supplémentation avec l'hydraste du Canada (*Hydrastis canadensis*) inhibe l'activité du CYP3A humain *in vivo*, Piver *et al.* [72] ont montrés l'effet inhibiteur du resvératrol sur les activités de CYP3A, CYP1A et CYP2E1, Breinholt *et al.* [73] ont rapportés que l'un des constituants actifs dans l'ail, c'est bien le sulfure de diallyle, est un inhibiteur puissant de l'enzyme de phase I, CYP2E1, Khan *et al.* [74] ont révélés l'effet protecteur de la rutine via l'inhibition de la CYP2E1. Plusieurs études récentes ont signalé que les flavonoïdes peuvent interagir avec les enzymes du CYP450 en inhibant la biosynthèse des enzymes ou leur activité catalytique. Ils peuvent s'interagir au niveau de la transcription ou de la traduction de gène ainsi que dans la modulation directe de l'activité du CYP450 [75]. Ce constat permet d'expliquer l'effet inhibiteur qui semble être lié à la structure des flavonoïdes, où le nombre et la position de leurs groupes hydroxyles déterminent le mécanisme de liaison à l'enzyme et par conséquent le niveau et le mode d'inhibition. Selon la littérature les flavonoïdes possédant de nombreux groupes hydroxyles sont des les plus puissants inhibiteurs du CYP450 *in vitro* [69,76]. L'effet antioxydant de l'extrait de n-BuOH de feuilles d'*Heliotropium undulatum* pourrait être du à la présence des acides phénoliques tel l'acide fumarique qui semble être le plus abondant suivi de l'acide protocatéchique, l'acide 4-hydroxybenzoïque. L'acide syringique et l'acide génésique. Les flavonoïdes tels La diosmine qui présente la plus forte concentration des

suivie par la naringénine et la morine, ces phytoconstituants prouvu par l'analyse HPLC/DAD sont dotée des activités antioxydante importante.

On peut conclure de cette partie que les deux extraits n-BuOH extraits BEHUS et BEHUL de l' *H.undulatum* à 200 mg/Kg ont préservé la fonction hépatique en modulant la Cyp2E1 et en neutralisant le stress oxydant hépatique et mitochondrial issus durant le traitement par le l'hydrazine (300 mg/Kg). L'extrait BEHUL de l' *H.undulatum* est le plus marquant comparativement à l'extrait BEHUS cet effet est proportionnel à la nature qualitative et quantitative des deux fractions.

### Références bibliographiques

- [1] Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic. Biol. Med*, 2004; 36: 718-744.
- [2] Ingh, U, Jialal, I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, 2006; 13: 129-142.
- [3] Hyun D H, Hernandez J O, Mattson M.P, Decabo R. The plasma membrane redox system in aging. *Aging Res. Rev*, 2006; 5: 209-220.
- [4] Zhou K and Yu L, "Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation," *LWT—Food Science and Technology*, 2004; 37(7): 717–721.
- [5] Rafat A, Philip K, Muniandy S. Antioxidant potential and phenolic content of ethanolic extract of selected Malaysian plants. *Res. J. Biotechnol*, 2010; 5: 16-19.
- [6] Modak B, Salina M, Rodilla J, Torres R. Study of the chemical composition of the resinous exudate isolated from *Heliotropium sclerocarpum* and evaluation of the antioxidant properties of the phenolic compounds and the resin. *Molecules*, 2009; 14: 4625-4633.
- [7] Modak B, Torres R, Lissi E, delle Monache F. Antioxidant capacity of flavonoids and a new arylphenol of the resinous exudate from *Heliotropium sinuatum*. *Nat. Prod. Res*, 2003; 17: 403-407.
- [8] Murugesh K, Yeligar V, Dash DK, Sengupta P, Maiti BC, Maity TK. Antidiabetic, antioxidant and antihyperlipidemic status of *Heliotropium zeylanicum* extract on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biol Pharm Bull*, 2006; 29(11): 2202-5.
- [9] Yaseen Nori M. AL-Shekhany<sup>1</sup> Talib O. AL-Khesraji<sup>2</sup> Alkaloid and glycoside contents and antioxidant activity of two *Heliotropium* species (Boraginaceae) from Kurdistan Region - Northern Iraq . *African Journal of Biotechnology*, 2010; 9(45): 7738-7743.
- [10] R. Meenatchi Ammal and G. Viji Stella Bai. Modulatory role of *heliotropium indicum* leaves on cynidetoxy in rats. *World Journal of Science and Research*, 2015; 1(1): 41-43.
- [11] H. Mohamed, M. Ons, E. T. Yosra, S. Rayda, G. Neji, and N. Moncef, "Chemical composition and antioxidant and radical-scavenging activities of *Periplocalaevigata* root bark extracts," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009; 89(5): 897-905.
- [12] Meenatchi Ammal R and Viji Stella Bai G. Free radical scavenging activity of *heliotropium indicum* leaves. *International Journal of Research in Plant Science*, 2014; 4(3): 63-67.
- [13] Walling C, "Fenton's reagent revisited," *Accounts of Chemical Research*, 1975; 8(4): 125-131.

- [14] Soler-Rivas C, Espin JC, Wichers H J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs *Phytochem. Anal Biochem*, 2000; 11: 330-338.
- [15] Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, 1991 281(1-2): 9-19.
- [16] Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 1995; 64: 97-112.
- [17] Kumar B S, Kumar M R S Babu K R. Growth and characterization of pure and lithium doped L-alanine single crystals for NLO devices. *Crystal Research and Technology*, 2008; 43(7): 745–75 2008.
- [18] Meenatchi Ammal R and Viji Stella Bai G. Free radical scavenging activity of heliotropium indicum leaves. *International Journal of Research in Plant Science*, 2014; 4(3): 63-67
- [19] Abdlaaty. A shahat, abeer Y ibrahim .Antioxydante capacity and polyphenolic content of seven sudi arabian medivcinal herbs traditionzllly used in saudi arabia. *indian journal of indian kowlege*, 2015; 28-35.
- [20] Yildirim, Mavi A, Oktay M, Kara A A, Algur O F, and Bilaloglu V. “Comparison of antioxidant and antimicrobialactivities of Tilia (TiliaargenteaDesf ex DC), sage (Salviatriloba L.), and Black tea (Camellia sinensis) extracts” .*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000; 48(10): 5030–5034.
- [21]Mohamed H, Ons M, Yosra ET, Rayda S, Neji G, and Moncef N. “Chemical composition and antioxidant and radical-scavengingactivities of Periplocalaevigatarootbarkeextracts” .*Journal of the Science of Food and Agriculture*,2009 ; 89(5): 897–905.
- [22] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, and Nakamura T, “Antioxidativeproperties of xanthan on the autoxidation of soybeanoil in cyclodextrinemulsion,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992; 40(6): 945–948.
- [23] Kyei S, Koffuor GA, Ramkissoon P, Abu EK. Sarpong Anti-Cataract Potential of Heliotropium indicum Linn on Galactose-Induced Cataract in Sprague-Dawley Rats. *CurrEyeRes*, 2016; 15:1-8.
- [24] SRINIVAS K, RAO M E B., RAO S S. Anti-inflammatory activity of heliotropium indicum linn. And leucas aspera spreng. In albino rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 2000 ; 32: 37-38.
- [25] A Naseem N.QureshiaBhanudansh S.KuchekarbNadeem A.LogadeaMajid A.Haleema ntioxidant and hepatoprotective activity of Cordia macleodii leaves. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2009; 17(4): 299-302.

- [26] Dean RT, FuS, Stocker R, Davies M J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 1997; 324(1):1-18.
- [27] Koleva I, Van Beek T A, Linszen J P H, A, De Groot, and Evstatieva L N. "Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods". *Phytochemical Analysis*, 2002; 13(1): 8–17.
- [28] Timbrell JA, Mitchell JR, Snodgrass WR, Nelson SD. Isoniazid hepatotoxicity: the relationship between covalent binding and metabolism in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 1980; 213:364–9.
- [29] Kayo A, Jerzy T P, Takashi Y N. Suppression of the Hydrazine-Induced Formation of Megamitochondria in the Rat Liver by Coenzyme Q10. *Toxicologic pathology*, 1995; 23(6): 667-675.
- [30] August O, Paul R, Ortiz, de Montalbano. Spin trapping of free radicals formed during microsomal metabolism of ethylhydrazine and acetylhydrazine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1981; 101(4): 1324-1330.
- [31] Satyanarayana S V, Bhattacharya P K. Pervaporation of hydrazine hydrate: separation characteristics of membranes with hydrophilic to hydrophobic. *Journal of Membrane Science*, 2004; 238(1-2):103–115.
- [32] Hussain SM, Frazierb JM. Involvement of apoptosis in hydrazine induced toxicity in rat primary hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 2003; 17(3): 343–355.
- [33] Timbrell JA. Studies on hydrazine hepatotoxicity. Biochemical findings. *Toxicol Environ Health*, 2009; 10(6):955-68.
- [34] Nelson SD, Mitchell JR, Timbrell JA, Snodgrass WR, Corcoran GB. Isoniazid and iproniazid: activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. *Science*, 1976; 193(3): 901-903.
- [35] Joseph S, Amenta, Abel M. Dominguez. The effect of hydrazine and congeners on C14O2 respiratory pattern of various metabolic substrates. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1965; 107:236-246.
- [36] Mary E, Bollarda, Hector C, Keuna, Olaf Beckonerta, Tim M.D, Ebbelsa, Henrik, Anttib. Comparative metabonomics of differential hydrazine toxicity in the rat and mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004; 204(2):135–151.
- [37] Waterfield CJ, Delaney J, Kerai MDJ, Timbrell JA. Impact of dietary oils and fats on lipid peroxidation in liver and blood of albino rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2014; 4(1): 52–58.

- [38] Sasidharan S, Aravindran, Latha L Y, Vijenthi R, Saravanan D, and Amutha S, “In vitro antioxidant activity and hepatoprotective effects of lentinula edodes against paracetamol-induced hepatotoxicity” *Molecules*, 2010 ;15(6):4478–4489.
- [39] James L. Boyer Bile .Formation and Secretion .*Compr Physiol*, 2013; 3(3): 1035–1078.
- [40] Anilakumar k r, Nagaraj ns, Santhanam.Protective effects of amla on oxidative stress and toxicity in rats challenged with dimethyl hydrazine. *Nutrition Research*, 2003; 24(4): 313–319.
- [41] Waterfield C J, Mesquita M, Parnham P, Timbrell JA. Correlations between in vivo and in vitro effects of toxic compounds: Studies with hydrazine. *Toxicology in Vitro*, 1997; 11(3): 217-227.
- [42] Berson A, DeBeco V, Lettéron P. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology*, 1998; 114(4):764-774.
- [43] Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies M J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 1997; 324(1):1-18.
- [44] Species S, Cengiz A, Mammadov R, Aykurt B C. Variations in antioxidant enzyme levels of rats exposed to ethanol extracts of *Convolvulus* species. *Industrial Crops and Products*, 2015; 74: 304–308.
- [45] Ibrahim M, Muhammad N, Naeem M, Deobald AM, Kamdem JP, Rocha JB. In vitro evaluation of glutathione peroxidase (GPx)-like activity and antioxidant properties of an organoselenium compound. *Toxicology in Vitro*, 2015; 29(5): 947–952.
- [46] Sinha BK. Enzymatic activation of hydrazine derivatives. A spintrapping study. *J BiolChem*, 1983; (258): 796-801.
- [47] Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy .*ISRN Oncology*, 2012; (12) 137-289.
- [48] Jewell S A, Di Monte D , Gentile A, Guglielmi A, Altomare E, Albano O. Decreased hepatic glutathione in chronic alcoholic patients. *Journal of Hepatology*, (1986); 3 (1): 1–6.
- [49] Tafazoli S, Mariam M, O'Brien PJ. Role of hydrazine in isoniazid-induced hepatotoxicity in a hepatocyte inflammation model. *Toxicol Appl Pharmacol* ,2008 ; 229(1):94-101.
- [50] Krähenbühl S. Alterations in mitochondrial function and morphology in chronic liver disease: Pathogenesis and potential for therapeutic intervention. *Pharmacology & Therapeutics*, 1993; 60(1): 1-38.
- [51] James A, Dykens Yvonne Will . The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discovery Today*, 2007; 12(17): 777-785.

- [52] Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 1997; 272(33):20313–6.
- [53] Ito K, Yamamoto K, Kawanishi S. Manganese-mediated oxidative damage of cellular and isolated DNA by isoniazid and related hydrazines: non-Fenton-type hydroxyl radical formation. *Biochemistry*, 1992; 31 (46): 11606-11613.
- [54] Saber M. Hussain, John M. Frazier .Cellular Toxicity of Hydrazine in Primary Rat Hepatocytes. *Toxicological Sciences*, 2002; 69(2): 424-432.
- [55] Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome. From mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 1997; 275(5303): 1132–1136.
- [56] Kang kwang L, and Urs A Boelsterli. Bypassing the compromised mitochondrial electron transport with methylene blue alleviates efavirenz/isoniazid-induced oxidant stress and mitochondria-mediated cell death in mouse hepatocytes. *Redox Biology*, 2014; 2: 599-609.
- [57] Sinha BK. Enzymatic activation of hydrazine derivatives. A spintrapping study. *J BiolChem*, 1983; (258): 796-801.
- [58] Mitchell JR, Zimmerman HJ, Ishak KG, Thorgeirsson UP, Timbrell JA, et al. Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. *Ann Intern Med*, 1976; (84): 181-192.
- [59] Nelson SD, Mitchell JR, Timbrell JA, Snodgrass WR, Corcoran GB. Isoniazid and iproniazid: activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. *Science*, 1976; 193(3): 901-903.
- [60] Ekström G, Ingelman-Sundberg M. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochem Pharmacol*, 1989; 38:1313–1319.
- [61] Hussain SM, Frazier JM. Cellular toxicity of hydrazine in primary rat hepatocytes. *ToxicolSci*, 2002; 69:424-32.
- [62] Jenner AM, Timbrell JA. Influence of inducers and inhibitors of cytochrome P450 on the hepatotoxicity of hydrazine in vivo. *Arch Toxicol*, 1994; 68: 349–357.
- [63] Caro AA, Cederbaum AI. Role of phospholipase A2 activation and calcium in CYP2E1-dependent toxicity in HepG2 cells. *J BiolChem*, 2003; 278: 33866–33877.
- [64] Caro AA, Cederbaum AI. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev PharmacolToxicol*, 2004; 44:27–42.
- [65] Delaney J, Timbrell JA. Role of cytochrome P450 in hydrazine toxicity in isolated hepatocytes in vitro. *Xenobiotica*, 1995; 25:1399– 410.

- [66] Vuilleumier N, Rossier MF, Chiappe A, Degoumois F, Dayer P, et al. CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *Eur J Clin Pharmacol*, 2006; 62: 423–429.
- [67] Yue J, Peng RX, Yang J, Kong R, Liu J. CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Pharmacol Sin*, 2004; 25: 699–704.
- [68] Kalyanaraman B, Sinha BK. Free radical-mediated activation of hydrazine derivatives. *Environ Health Perspect*, 1985; 64: 179-184.
- [69] Ho P-C, Saville DJ, Wanwimolruk S. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2001;4:217-27.
- [70] Brantley SJ, Oberlies NH, Kroll DJ, Paine MF. Two flavonolignans from milk thistle (*Silybum marianum*) inhibit CYP2C9-mediated warfarin metabolism at clinically achievable concentrations. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332:1081-7.
- [71] Gurley BJ, Swain A, Hubbard MA, Hartsfield F, Thaden J, Williams DK et al. Supplementation with goldenseal (*Hydrastis canadensis*), but not kava kava (*Piper methysticum*), inhibits human CYP3A activity in vivo. *Clin Pharmacol Ther*, 2008; 83(1):61-9.
- [72] Piver B, Berthou F, Dreano Y, Lucas D. Inhibition of CYP3A, CYP1A and CYP2E1 activities by resveratrol and other non volatile red wine components. *Toxicol. Lett*, 2001; 125(1-3):83-91.
- [73] Breinholt VM, Offord EA, Brouwer C, Nielsen SE, Brøsen K, Friberg T. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food Chemical Toxicol*, 2002; 40:609–16
- [74] Khan RA, MR Khan, S Sahreen. CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidant status in rat. Khan et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2012; (178)12: 2-6
- [75] Hodek P, Trefil P, Stiborova M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact*, 2002; 139:1-21.
- [76] Pang CY, Mak JW, Ismail R, Ong CE. In vitro modulatory effects of flavonoids on human cytochrome P450 2C8 (CYP2C8). *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 2012; 385: 495–502.

## 2. 2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de la plante H.undulatum

### 2. 2. 1.Évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro

#### 2. 2. 1.1. L'effet de piégeage de l'oxyde nitrique NO°

Les résultats de l'activité de piégeage du NO° des extraits BEHUS et BEHUL de sont illustrés par la (figure 5.17).

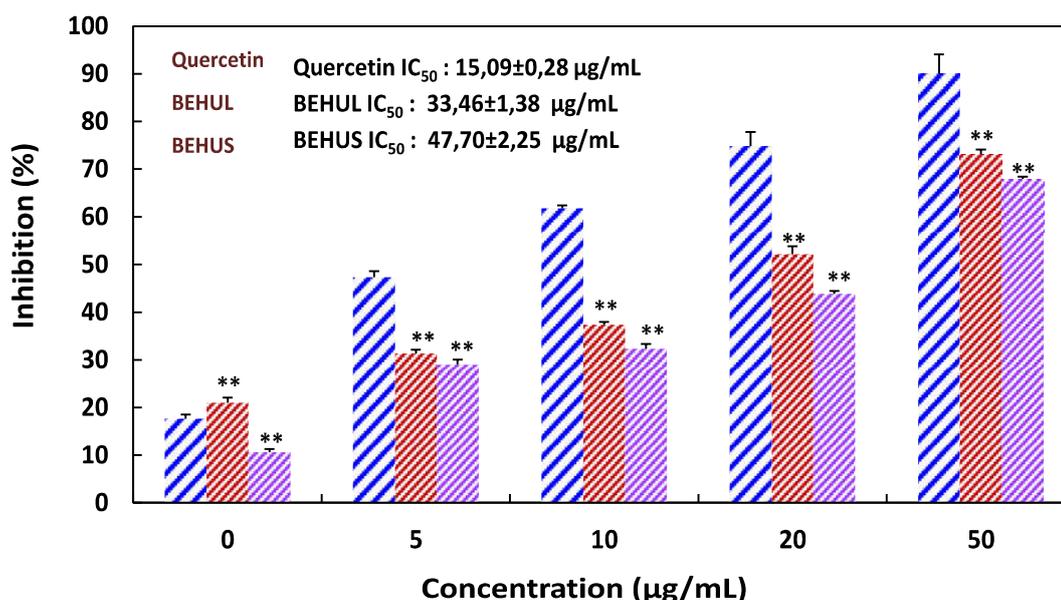


Figure 5.17 :L'effet scavenger des deux extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) et la quercétine contre le radical (NO°). Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3). \*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

Le composé nitroprussiate de sodium se décompose en solution aqueuse à pH physiologique (7.2) en produisant le NO°. Dans des conditions aérobies, le NO° réagit avec l'oxygène pour produire des produits stables (nitrate et nitrite), dont les quantités peuvent être déterminées à l'aide du réactif de Griess [1]. Les résultats obtenus montrent que l'effet de piégeage de l'oxyde nitrique est plus efficace dans le cas de BEHUS avec une inhibition maximale de 73 $\pm$ 0,94%, ce pourcentage a été observé à la concentration de 50 µg/mL comparativement à l'BEHUL (68 $\pm$ 0,41%). Les valeurs IC<sub>50</sub> des BEHUL et BEHUS, et de la quercétine prouvant un effet scavenger vis-à-vis le (NO°) étaient 33.46 $\pm$ 1.38µg/mL,47.7 $\pm$ 2.25µg/mL, et 15.09 $\pm$ 0.28µg/mL respectivement (la figure 5.17). La capacité de neutralisation de (NO°) pourrait être due à l'existence des phyto-constituants qui

entrent en compétition avec l'oxygène pour interagir avec le monoxyde d'azote. Une étude effectuée sur l'extrait éthanolique de *H. indicum* Linn qui a montré une activité inhibitrice puissante sur la production d'oxyde nitrique ( $IC_{50} = 24,17 \mu\text{g/mL}$ ) [2]. Dans une autre étude portée sur *Cordia macleodii* qui appartient à la même famille de notre plante (Boraginaceae) le pourcentage maximal d'inhibition des radicaux oxyde nitrique était 72,70% mais à une concentration très élevée ( $800 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) [3]. Au niveau des flavonoïdes, la configuration d'hydroxyle du cycle B est le déterminant le plus significatif de la prise de ROS et de RNS. Les groupes hydroxyles sur le cycle B donnent l'hydrogène et un électron à des radicaux hydroxyles, peroxy, et peroxy-nitrite menant à des radicaux flavonoïdes stables. L'inhibition du RNS par les flavonoïdes implique la même règle que l'inhibition du ROS [4]. L'oxyde nitrique ( $\text{NO}^\circ$ ) est un radical libre réactif produit par les phagocytes et les cellules endothéliales, pour donner des espèces plus réactives telles que le peroxy-nitrite qui se décompose d'avantage en formant un radical ( $^\circ\text{OH}$ ) [5,6,7,8]. Nos résultats révèlent que l'extrait BEHUL pourrait réduire significativement le taux d'oxyde nitrique qui jouerait un rôle crucial dans l'inflammation. Ainsi, nos résultats confirment fortement l'utilisation traditionnelle de *H. undulatum* dans les inflammations et la cicatrisation des plaies [9].

### 2. 2. 1.2. Inhibition de la dénaturation des protéines: activité anti-arthritique

La dénaturation des protéines tissulaires est l'une des causes bien documentées concernant l'arthrite rhumatoïde et inflammatoire. La production d'auto-antigènes dans certaines maladies arthritiques peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo* [10].

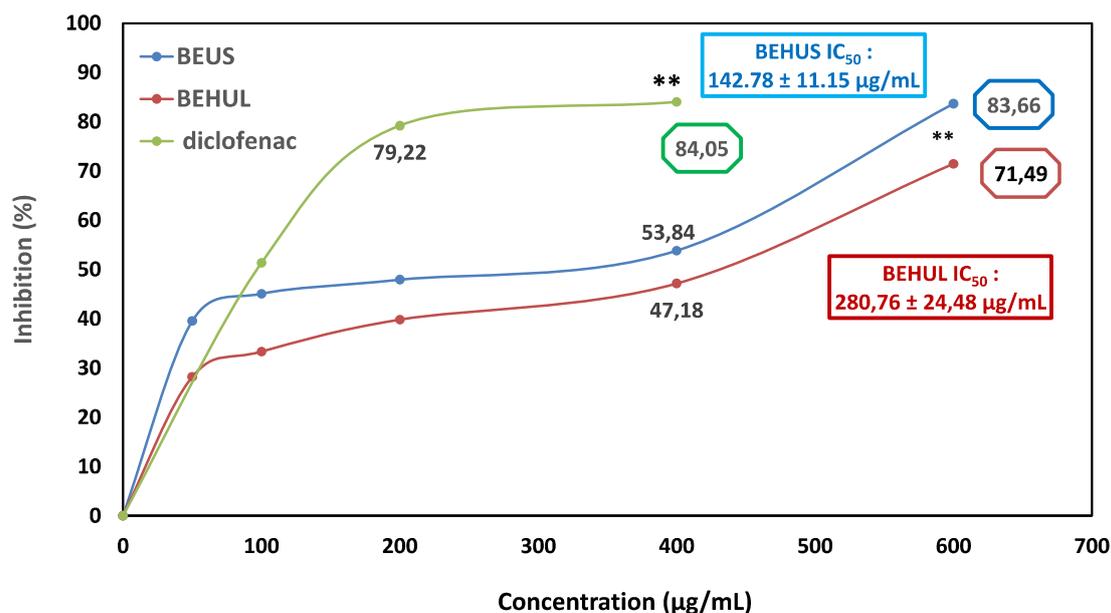


Figure 5.18 : Effet des deux extraits BEHUS et BEHUL et le diclofenac l'inhibition de la dénaturation des protéines. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

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

\*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

La (figure 5.18) expose les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits BEHUS et BEHUL en termes de pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine du sérum bovine (BSA). Ces résultats montrent une inhibition dépendante à la concentration de la dénaturation de BSA des deux extraits BEHUS et BEHUL dans la gamme 100 - 600  $\mu\text{g/mL}$ . Les deux extraits présentent une activité anti-dénaturation significative (47,18 - 53,84 %) à 400  $\mu\text{g/mL}$ . A la même concentration le diclofénac a manifesté une dénaturation de BSA de 84.05%. L'inhibition de l'extrait BEHUS est plus remarquable par rapport à l'extrait BEHUL. A 600  $\mu\text{g/mL}$ , les deux extraits BEHUS et BEHUL ont manifesté un pourcentage d'inhibition dans l'ordre de 83,66 % et 71.49% respectivement. La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation. Cette dernière représente la réponse tissulaire aux blessures, et pour cela, un processus complexe de réactions enzymatiques doit être impliqué [11]. D'après la littérature il a été rapporté que la dénaturation des protéines est l'une des causes de la polyarthrite rhumatoïde [11, 12]. La production d'auto-antigènes dans certaines maladies rhumatismales peut être due à la dénaturation *in vivo* des protéines. Le mécanisme de dénaturation implique probablement une altération en électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure collage qui maintien la

structure tridimensionnelle des protéines [13]. En outre, la polyarthrite rhumatoïde est un trouble inflammatoire systémique chronique qui peut affecter de nombreux tissus et organes, mais qui s'attaque principalement aux articulations synoviales [14]. Les plantes médicinales contiennent des flavonoïdes, des terpènes, des quinones, des catéchines, des alcaloïdes, des anthocyanes et des phytoconstituants d'anthoxanthines, ayant des effets anti-inflammatoires et anti arthritique [15]. Des études précédentes ont montré que l'espèce *Tecoma stans* (Linn), appartenant à la famille (Bignoniaceae), testée pour une activité antiarthritique a révélée une certaine efficacité [16].

Vu les résultats obtenus on peut suggérer que l'extrait butanolique des tiges est plus efficace que l'extrait des feuilles dans le contrôle de la production d'auto-antigène via l'inhibition de la dénaturation des protéines. L'activité inhibitrice de la dénaturation de protéines est peut être accordée à l'existence de différents phytoconstituants bioactifs tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes (naringenin, diosmin, morine), et les acides phenoliques (acide fumarique, acid gentisique, acide chlorogénique, acide 4-hydroxy benzoïque, acide protocatechuique, acide vanilique, acide Syringique).

### 2. 2. 1.3. Stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC)

Les résultats relatifs à la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC) de nos extraits sont présentés graphiquement par la (figure 5.19).

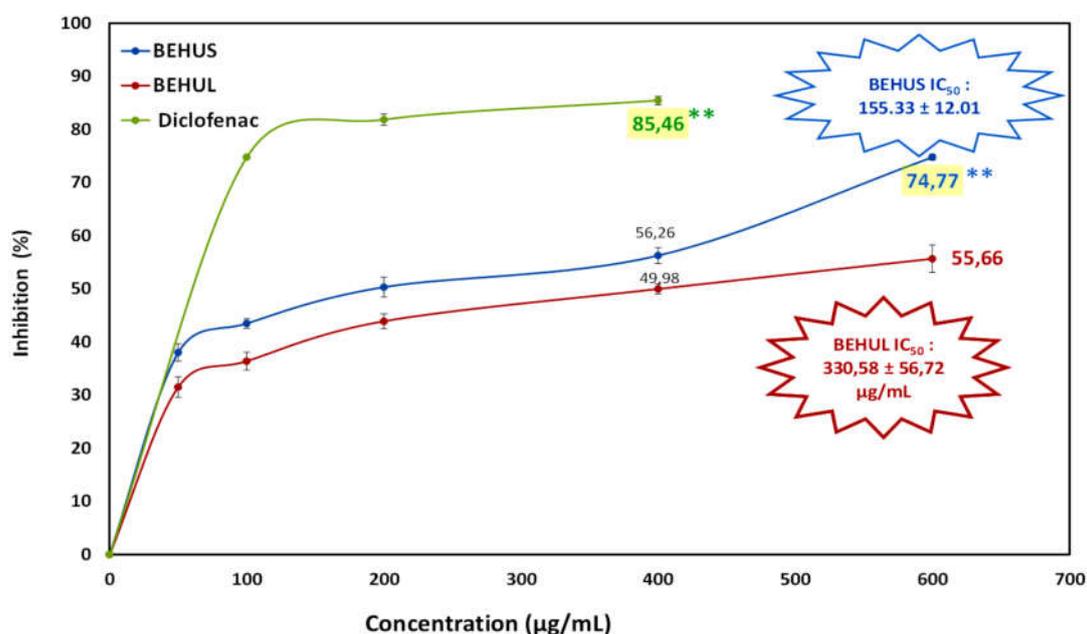


Figure 5.19 : Effet des deux extraits BEHUS et BEHUL et le diclofenac sur la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC). Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

La stabilisation des membranes des globules rouges HRBC a été utilisée comme une méthode pour étudier l'inflammation *in vitro* contre la lyse membranaire des globules rouges, car la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale [17] et sa stabilisation implique que l'extrait peut stabiliser les membranes lysosomales. L'examen attentif des courbes présentées dans la (figure 5.19) permet de constater d'abord que tous les traitements (BEHUL, BEHUS, diclofenac) dotés d'un certain pouvoir d'inhibition de la lyse des membranes induite par l'hypotonie. Néanmoins, cette inhibition est en faveur de l'extrait BEHUS avec un taux de 56.26% par rapport à la fraction BEHUL (49.18%), cette inhibition a été retenue à une concentration de 400 µg/ml. La référence, le diclofénac est manifesté par une inhibition maximale de 84.08% à la même concentration. L'inhibition maximale exercée par les deux extraits BEHUS et BEHUL enregistrée à 600 µg/ml a été de l'ordre de 83,66% et 71,49% respectivement avec une IC<sub>50</sub> équivalant à (155, 33 ± 12, 01 µg/ml et 330, 58 ± 56, 72 µg/ml. La vitalité des cellules dépend de l'intégrité de leurs membranes, et c'est l'exemple des globules rouges. L'exposition de ces derniers aux conditions défavorables ou aux substances nocives telles que le milieu hypotonique conduit à une lyse de leurs membranes accompagnée par une hémolyse et oxydation de l'hémoglobine. L'effet l'hémolytique de la solution hypotonique est liée à l'accumulation excessive de liquide dans la cellule résultant de la rupture de sa membrane [18]. La stabilisation lysosomiale est importante pour limiter la réponse inflammatoire en empêchant la libération des constituants lysosomals des neutrophiles. Les enzymes lysosomales libérées lors d'inflammation produisent des divers troubles. L'activité extra-cellulaire de ces enzymes est associée à une inflammation aiguë ou chronique. Les médicaments non stéroïdiens agissent soit en inhibant ces enzymes lysosomales, soit en stabilisant la membrane lysosomale [13].

On conclut, cette étude a révélé que la fraction n-butanolique des deux extraits des feuilles et des tiges préparées contiennent des quantités élevées de composés phénoliques et des flavonoïdes totaux, sachant que ces derniers présentant une activité anti-oxydante solide et une activité anti-inflammatoire. Ces composés bioactifs sont considérés comme inhibiteurs ou éliminateurs de radicaux libres ou agissant éventuellement comme anti-oxydant primaires qui stabilisent la membrane des globules rouges. *Le mécanisme d'action de ces composés rest* encors mal connu, mais généralement les polyphénols ont un effet inhibiteur en empêchant la fuite des protéases au niveau de la zone inflammatoire.

## 2.2.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire invivo

### 2.2.2.1. Détermination du volume de l'œdème de la patte induit par la carragénine

L'estimation du volume de l'œdème de la patte induit par la carragénine nous a permis d'évaluer *in vivo* l'activité anti-inflammatoire des deux extraits BEHUS et BEHUL. L'inflammation est induite par l'injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche des rats.

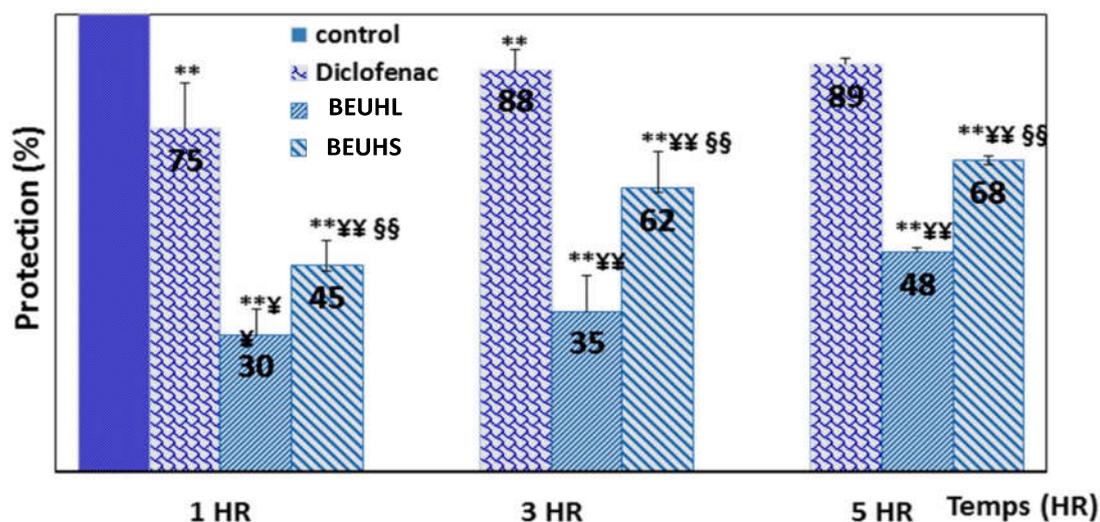


Figure 5.20 : Effet des deux extraits BEHUS et BEHUL sur l'œdème de la patte induit par la carragénine. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

¥¥ : comparaison avec le BEHUL (¥ $p < 0.05$ , ¥¥ $p < 0.01$ ).

§§ : comparaison avec le BEHUS (§ $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$ ).

Dans notre étude, la progression inflammatoire du volume d'œdème a été suivie entre 1 et 5 h après l'injection de la carragénine. La (figure 5.20) montre que l'extrait BEUHS à 200 mg/kg a significativement ( $p < 0.01$ ) réduit le gonflement dès la première heure (45 % jusqu'à la dernière phase (5 h) (68 %). La réduction du gonflement retenue de l'extrait BEUHL était significativement ( $p < 0.01$ ) inférieure à celle de de l'extrait BEUHS à 200 mg/kg durant toute la période expérimentale. Ces résultats pourraient être clairement comparables à ceux du diclofenac (10 mg/kg), qui a prouvé 75% de réduction à la première heure et 89% de réduction après 5 heures. L'évolution du diamètre d'œdème estimée en fonction de temps est subdivisée en deux phases : la première phase de 0 à 1 h, la deuxième phase de 1 à 5 h. Dans

l'heure qui suit l'injection de la carragénine l'inflammation devient visible et l'œdème augmente progressivement et atteint une intensité maximale au bout de cinq heures. Sachant que la carragénine est un mucopolysaccharide sulfaté provenant d'une rhodophyceae, elle provoque une inflammation typiquement liée à l'activation de la cyclooxygénase [19]. Cette injection entraîne une augmentation du diamètre de la patte de rat dans la première phase de 0 à 1 h. Comme la carragénine induit l'inflammation aiguë, cette dernière est la réponse initiale du corps aux stimuli nocifs, et par conséquent conduit à la migration des leucocytes (granulocytes surtout) vers le tissu lésé. Une cascade d'événements biochimiques propage et mûrit la réponse inflammatoire, impliquant le système vasculaire local, le système immunitaire et diverses cellules dans le tissu endommagé [20]. Ce test est très sensible aux anti-inflammatoires non stéroïdiens, il est accepté comme un outil phlogistique utile pour la recherche de nouvelles thérapies médicamenteuses [21]. En outre, l'injection de la carragénine chez les rats produit un œdème biphasique typique associé à la production de plusieurs médiateurs inflammatoires, dont la première phase provoque la synthèse de médiateurs chimiques, tels que l'histamine et la sérotonine qui entretiennent l'inflammation. Dans la seconde phase, la carragénine induit la synthèse des prostaglandines, la libération des protéases. Bourdon *et al.* [22] ont constaté que l'injection de carragénine dans la patte du rat induit la libération de la bradykinine qui entraîne plus tard la biosynthèse de la prostaglandine et d'autres autacoïdes responsables de la formation des exsudats inflammatoires. Le prétraitement des rats par l'extrait BEHUS confirme qu'il a une activité anti-inflammatoire car nous avons observé une diminution remarquable dans le diamètre de la patte des rats, ce qui peut expliquer la stabilisation des médiateurs inflammatoires. Le mode d'action de nos extraits semble être analogue au diclofénac. Selon la littérature le diclofénac agit dès la première heure et son effet est en relation avec plusieurs voies moléculaires (cytokines pro-inflammatoires, phospholipase, COX) généralement à travers le facteur nucléaire de transcription [23].

L'efficacité la plus importante de l'extrait des tiges (BEHUS) pourrait être liée à son profil chimique, particulièrement à la présence de composés polyphénoliques. Parmi ces composés se trouvent les flavonoïdes qui sont capables d'inhiber les oxydants libérés par les leucocytes et d'autres phagocytes dans la zone inflammatoire entretenant ainsi l'inflammation. Les flavonoïdes altèrent la synthèse des éicosanoïdes (médiateurs de l'inflammation), ils diminuent le rapport leucotriène/prostaglandine en modifiant l'activité lipoxigénase [24]. Selon des études confirmant cette illustration, elles ont montré que l'hespéridine, administrée par voie sous-cutanée, présente une activité anti-inflammatoire

significative chez le rat dont l'œdème a été induit par la carragénine [25]. Plusieurs études ont rapporté que les flavonoïdes inhibent la migration des leucocytes en bloquant leur adhésion à la paroi vasculaire en inhibant les molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et E selectine dans les cellules endothéliales vasculaires, [26].

Certaines recherches ont démontré que l'effet inflammatoire induit par la carragénine est associé aux radicaux libres. Ces derniers inhibent les enzymes COX qui catalysent la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandine, thromboxanes et prostacycline. En tenant compte de nos résultats, on peut conclure que l'action de l'extrait BEHUS pourrait être due aux substances naturelles qui ont un effet anti-sérotoniques et anti-histaminiques. Ces résultats suggèrent que les propriétés anti-inflammatoires de l'extrait BEHUS pourraient être les résultats de l'inhibition d'iNOS, et COX-2, l'interleukine-6, IL-1 $\beta$ , et l'expression de TNF- $\alpha$  [27]. Ceci, nous encourageons à faire d'autres investigations approfondies dans cette optique de continuité et d'envisager un autre profil qui concerne les marqueurs pro-inflammatoires.

### 2.2.2.2. Evaluation du taux des protéines carbonyles hépatiques

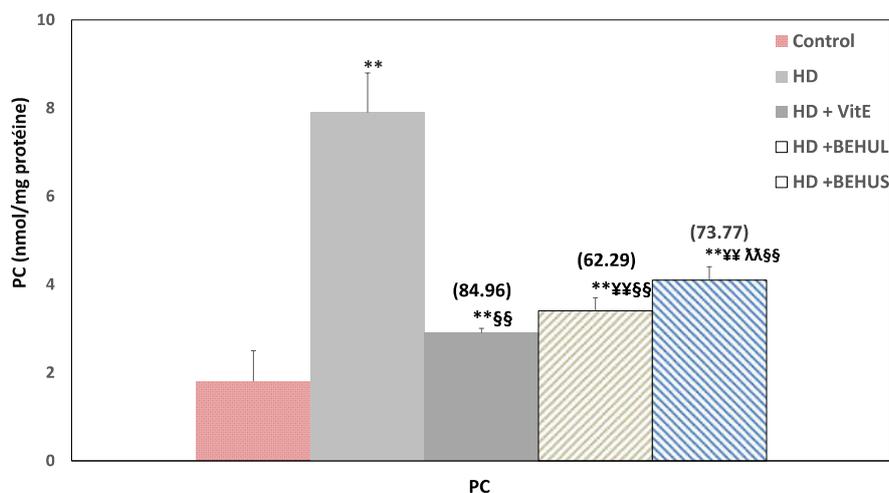


Figure 5.21 : L'effet anti- inflammatoire des deux extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) et la vitamine E sur le taux des protéines carbonyles hépatiques chez les rats intoxiqués par l'hydrazine (300mg/kg).\*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

¥¥ : comparaison avec le BEHUL (¥p < 0.05, ¥¥p < 0.01).

§§ : comparaison avec le BEHUS (§p < 0.05, §§p < 0.01).

Les valeurs entre parenthèses : % de protection

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SD (n=6).

Le taux élevé de PC reflète d'une carbonylation sévère des protéines, chez les rats traités par l'hydrazine qui a provoquant des réponses inflammatoires. La (figure 5.21) mentionne une augmentation significative des niveaux de PC chez les rats traités par l'hydrazine à (300 mg/kg). Le traitement avec les extraits BEHUS et BEHUL à (200 mg/kg) a diminué de manière significative les niveaux élevés de PC (73.77 %) et (62.29 %) respectivement. Les valeurs du groupe traité par BEHUS semblent sont comparables à celle du groupe traités avec la vitamine E, (84.96%).

Le stress oxydatif, ROS et RNS provoquent l'oxydation des protéines, communément les acides aminés ; lysine, arginine et proline. Le clivage oxydatif du squelette peptidique via la voie d' $\alpha$ -amidation, ainsi que le clivage oxydatif des résidus glutamyl, et la formation de dérivés réticulés protéine-protéine et les dommages membranaires par oxydation lipidique donnent naissance à des aldéhydes et des cétones réactifs connus sous le nom de protéines carbonyles [28]. Les protéines carbonyles sont le résultat du clivage oxydatif du squelette protéique, et de l'oxydation directe les acides aminés tels que la lysine, l'arginine, l'histidine, la proline, l'acide glutamique et thréonine, ou par la fixation d'aldéhydes qui sont le produit de la peroxydation des lipides [29,30].

### 2.2.2.3. Evaluation de L'activité de la MPO et le NO hépatique

L'effet des deux extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) sur l'expression de la MPO et le NO chez les rats intoxiqués par l'hydrazine (300mg/kg) sont présentés par la (figure 5.22).

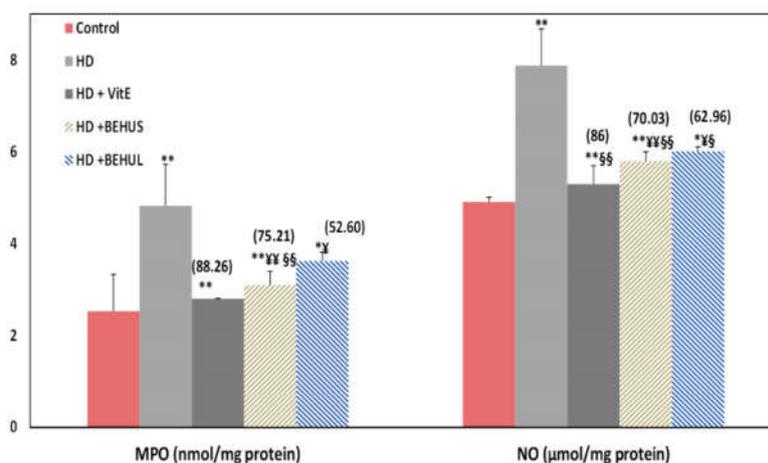


Figure 5.22 : L'effet anti- inflammatoire des deux extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) et vitamine E sur l'expression de l'activité de la MPO et le NO chez les rats intoxiqués par

l'hydrazine (300mg/kg).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

¥¥ : comparaison avec le BEHUL (¥p < 0.05, ¥¥p < 0.01).

§§ : comparaison avec le BEHUS (§p < 0.05, §§p < 0.01).

Les valeurs entre parenthèses : % de protection

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SD (n=5).

Les deux extraits BEHUL et BEHUS ont diminué l'activité de la MPO avec un pourcentage de 52.60% et 75.21% respectivement ; l'effet de l'extrait BEHUS est plus proche à celui de groupe traité par la vit E (88.26%). De même, les extraits BEHUL et BEHUS ont diminué l'activité de NO avec un pourcentage de (62.96 %) et (70.03 %) cette diminution est plus prononcée par l'extrait BEHUS. L'inflammation hépatique est caractérisée histologiquement par l'infiltration de leucocytes polymorpho-nucléaires, de monocytes et de macrophages. Ils sont activés par divers médiateurs, notamment les prostaglandines, les leucotriènes, le facteur d'activation plaquettaire et les cytokines [31]. La MPO est une enzyme qui se trouve dans les neutrophiles et son activité dans le foie est liée à l'infiltration des neutrophiles [32]. L'évaluation de l'activité MPO est bien établie pour la quantification de l'inflammation hépatique [33]. Dans ce modèle, la MPO est considéré comme une enzyme majeure responsable des lésions tissulaires et un marqueur sensible et spécifique de l'inflammation. L'activation de la consommation d'oxygène implique le fonctionnement de la NADPH-oxydase, ce dernier avec la MPO agissant ensemble pour produire des espèces réactives de l'oxygène et l'oxydation des matériaux biologiques [32]. Récemment, il y a eu un regain d'intérêt pour la MPO, cette enzyme pro-inflammatoire qui peut être mesurée dans le sang périphérique. Au cours d'une activation normale, l'activité de la MPO s'exerce dans les vacuoles intra-cellulaires et seules des quantités limitées de MPO sont libérées dans le milieu extracellulaire (estimées aux environs de 10 à 15 %) [34]. La MPO catalyse la conversion du chlorure et du peroxyde d'hydrogène en hypochlorite et elle est sécrétée pendant l'état inflammatoire. Elle a été impliquée dans l'oxydation des lipides contenus dans le cholestérol LDL. De plus, des concentrations élevées en MPO dans les liquides biologiques au sein des tissus est le signe d'une activation importante ou excessive des neutrophiles. [35,36]. D'autre part, La MPO réagit avec les ( $\text{NO}^{2-}$ ) et ( $\text{ONOO}^-$ ) directement ou via la production d'acide hypochlorite ( $\text{HOCl}$ ), pour générer des ERO sous forme des dérivés chlorés. En outre, aux concentrations physiologiques de chlorure, la MPO réagit avec le peroxyde d'hydrogène

formé par l'explosion respiratoire pour catalyser la formation d'acide hypochloreux/hypochlorite ( $\text{HOCl} / \text{OCl}^-$ ) et d'autres espèces oxydantes. Ces oxydants peuvent contribuer aux dommages tissulaires de l'hôte. En absence de concentrations physiologiques de chlorure, le système MPO- $\text{H}_2\text{O}_2$  peut également former des espèces réactives de l'azote, qui peuvent initier la peroxydation lipidique ou former des résidus de protéine tyrosine [37]. En effet, le NO (oxyde nitrique) est un autre médiateur important dans la pathogenèse des maladies inflammatoires [38] que nous avons également évalué. Par conséquent, la MPO et le NO affectent le processus d'inflammation par des mécanismes moléculaire ; et la réaction entre eux est un signe d'inflammation locale. La MPO joue un rôle clé dans l'altération de la biodisponibilité du NO dans les conditions inflammatoires. La MPO peut consommer du NO en tant que substrat enzymatique direct et en générant des radicaux libres qui ne consomment pas le NO [39]. Les voies réactionnelles de fonctionnement de la MPO et de NO sont régulées par plusieurs paramètres : le pH, la production d' $\text{O}_2^\bullet$ , la concentration en  $\text{Cl}^-$ , les concentrations en réducteurs (ascorbate, méthionine...) [34]. Nos résultats suggèrent que l'hydrazine a augmenté le niveau de NO et l'activité de MPO. D'autres études suggèrent que l'inflammation conduit à la synthèse des protéines extra-cellulaires et l'augmentation de l'expression des médiateurs inflammatoires aux lésions tissulaires [40]. De nombreuses études ont révélé qu'une augmentation du stress oxydatif et de l'activité de l'iNOS est une caractéristique notable de l'inflammation, qui entraîne une cascade pathologique de réactions radicalaires et produit en outre d'avantage des radicaux libres oxydants. Les échecs des mécanismes de défense antioxydants endogènes favorisent la formation de radicaux libres excessifs et les dommages tissulaires conséquents [34].

D'autres recherches comparables a notre étude misent en évidence l'existence d'une corrélation entre l'activité anti-inflammatoire, et la diminution des taux de la MPO et le NO, et la teneur de l'extrait en composés phénoliques, afin de démontrer l'activité des extraits végétaux contre l'inflammation et la surproduction de NO et la MPO [41]. Minaiyan *et al.* [41] ont étudiés l'effet des extraits hydro-alcooliques de *P. spinosa* suite à une induction de la colite par administration intra-rectale d'acide acétique (3%) chez les rats ; ils ont trouvé que le prétraitement des animaux avec l'extrait de *P. spinosa* a normalisé l'augmentation de l'MPO. D'autres études ont soulignées l'effet de *Ficus bengalensis* et *Punica granatum* peel pour diminuer les dommages tissulaires et l'inflammation suggérant leurs propriétés anti-inflammatoires contre la surproduction de NO et MPO [42,43]. Un autre model d'étude qui porte sur l'efficacité de *T. chebula* contre la toxicité du côlon induite par le DMH et son rôle

dans la réponse inflammatoire a montré que le traitement par *T. chebula* a amélioré les effets néfastes induits par le DMH à travers un mécanisme de protection via la réduction des niveaux d'expressions d'activités des MPO, NO et l'infiltration des mastocytes [44]. D'autres études réalisées par Vibha et al [45] suggèrent que les tétraterpanoïdes présentés dans la plante *Cissus quadrangularis* sont responsables de la réduction de l'expression de MPO.

Prenant l'ensemble de ces données, on peut récapituler que l'extrait *n*-BuOH de *H.undulatum* présente une variété de composés phyto-chimiques qui exercent un effet anti-inflammatoire via la réduction de la surproduction des médiateurs inflammatoires impliqués dans la réaction inflammatoire.

Les composés phénoliques et les flavonoïdes présents dans nos extraits des feuilles et des tiges peuvent être responsables de son effet anti-inflammatoire. Les flavonoïdes ont également des propriétés stabilisatrices des mastocytes [44] en raison que la morine et la catéchine sont capables de réduire l'enzyme MPO et NO [46], et par conséquent une diminution de l'influx des neutrophiles dans les tissus enflammés. D'autre part, les acides phénoliques ont un effet anti-inflammatoire reconnu.

### 2.2.2.4. Evaluation de taux des cytokines hépatiques, TNF- $\alpha$ et IL- $\beta$

L'évaluation des activités inhibitrices des deux extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) sur la production de médiateurs pro-inflammatoires induites par l'hydrazine (300mg/kg) est présentée par la (figure 5.23) :

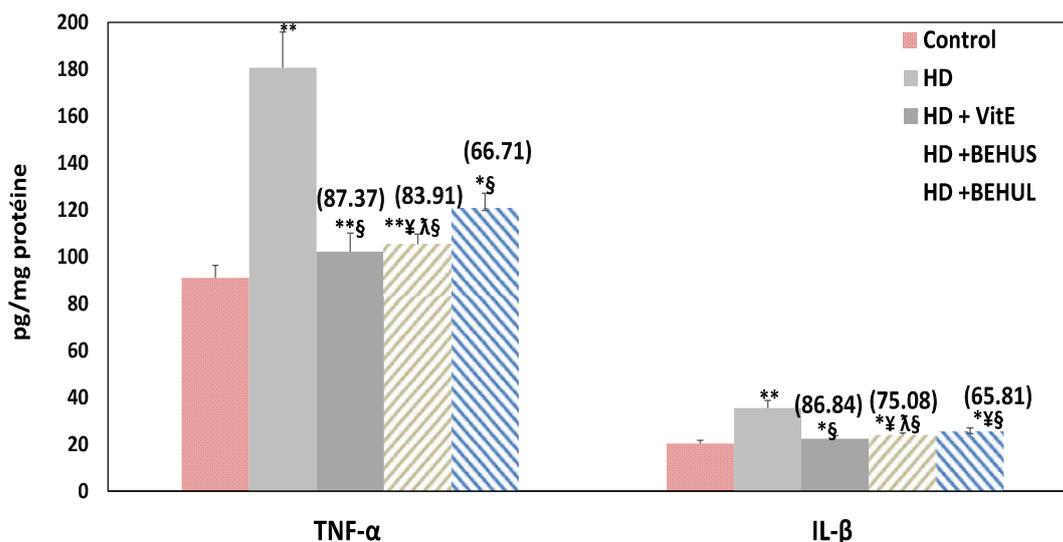


Figure 5.23 : L'effet anti-inflammatoire des deux extraits des deux extraits BEHUS et BEHUL (200mg/kg) et la vitamine E sur le taux des cytokines TNF- $\alpha$  et IL- $\beta$  dans la lésion

hépatique induite par l'hydrazine (300mg/kg).

\*\* : comparaison avec le contrôle (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

¥¥ : comparaison avec le BEHUL (¥ $p < 0.05$ , ¥¥ $p < 0.01$ ).

§§ : comparaison avec le BEHUS (§ $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$ ).

Les valeurs entre parenthèses : % de protection

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SD (n=5).

Les résultats obtenus (figure 5.23) montrent que l'administration de l'hydrazine a augmenté d'une façon significative les valeurs de TNF- $\alpha$  à (180,56 $\pm$ 15,33 pg/mg protein) et IL- $\beta$  à (35,4 $\pm$ 3,3 pg/mg protein). Le prétraitement avec l'extrait BEHUS a marqué une diminution importante du TNF- $\alpha$  (83, 91%) et du IL- $\beta$  (75, 08 %), cette effet pourrait être considéré comme comparables à celui de la VitE (87.37%) et (86.84%) respectivement. L'extrait BEHUL a montré un effet moins efficace vis-à-vis l'inflammation induite par l'hydrazine en réduisant la surproduction du TNF- $\alpha$  et IL- $\beta$  à un pourcentage de 66.71 % et 65.81 % respectivement. La lésion hépatique est associée à une réponse inflammatoire impliquant le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et d'autres facteurs. Le TNF- $\alpha$  joue un rôle central dans la lésion hépatique en déclenchant la production des autres cytokines à son tour qui favorisent la fibro-génèse et activent d'avantage l'explosionoxydative [47].

De nombreux chercheurs décrivent que l'inflammation est une réaction qui commence généralement dans une zone localisée, puis se propage rapidement vers la périphérie accompagnée de cytokines inflammatoires libérées dans le système de circulation, en particulier IL-1, IL-6 et TNF $\alpha$  [48]. La principale fonction des cytokines est de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires, ce qui entraîne la résiliation d'agents pathogènes envahissants ou la réparation de tissus endommagés. Les cytokines effectuent ces fonctions en activant les voies de signalisation en aval par interaction avec leurs récepteurs sur la membrane cellulaire. L'inhibition du TNF $\alpha$  est devenue la clé pour contrôler l'inflammation, donc c'est un biomarqueur dans l'évaluation de la réponse inflammatoire. Le TNF- $\alpha$  est principalement produit par les macrophages et dans une moindre mesure, par d'autres types de cellules [49]. Il est le prototype de cytokines pro-inflammatoires, car non seulement induit sa propre sécrétion, mais stimule également la production d'autres cytokines inflammatoires et les chimiokines du choc septique, de l'inflammation et de la cytotoxicité [50]. D'autre part, l'interleukine 1 est produite par des macrophages activés en tant que proprotéine, qui est transformée de manière protéolytique jusqu'à sa forme active par la

caspase 1 (CASP1 / ICE). [51]. Comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  joue un rôle important dans le contrôle de la migration des leucocytes, en particulier des neutrophiles, en augmentant l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales et des chimiokines telles que le MCP-1 qui contribuent au recrutement de la circulation des monocytes dans les tissus [52]. Plusieurs études expérimentales récentes ont soulignées l'intérêt de l'application des polyphénols dans la modulation de l'inflammation. Ces dernières années, un grand nombre d'études ont démontré le rôle important des plantes médicinales sur les activités anti-inflammatoire. A titre d'exemple une étude a illustré les propriétés anti-inflammatoires de l'extrait de *Harpagophytum procumbens* et ses activités inhibitrices sur la sécrétion des marqueurs pro-inflammatoire et la production des cytokines (TNF $\alpha$ , IL6, IL1 $\beta$ , IL8) [53]. Selon d'autres études l'*Allium sativum* L. (Liliaceae) a inhibé l'expression du TNF- $\alpha$  dans les reins des rats exposés à la streptozotocine [54].

Les flavonoïdes ont des capacités à interférer avec les systèmes pro-oxydants et pro-inflammatoires, en empêchant leurs conséquences délétères [55]. Il a été rapporté que l'activité anti-inflammatoire des flavonoïdes tels que la lutéoline, naringénine, et la diosmine pourraient être médiée par l'inhibition d'enzymes métabolisant l'acide arachidonique, cyclooxygénase et lipoxygénase [56]. D'autres flavonoïdes tels que les flavones (chrysin, 3 hydroxyflavon et galangine), des chalcones (ayant une 3-4 substitution d'hydroxyle) sont des inhibiteurs de COX. Les flavonols tels que le kaempferol, la morine et la quercétine sont des inhibiteurs 5-lipoxygénase, alors que la plupart des flavanols sont des inhibiteurs de COX-1 [57]. Dans notre étude, l'analyse chimique de l'extrait butanoliques des tiges a révélé la présence d'un nombre de flavonoïdes, des acides phénoliques, et des coumarines. Ceci pourrait nous soutenir de supposer que ces substances sont responsables de son activité anti-inflammatoire.

Prenant l'ensemble des données phytochimique qui ont été analysés par RP-HPLC et par la CCM, on peut déduire que l'extrait BEHUS présente une variété de composés phytochimiques comprenant des acides phénolique dont l'acide fumarique semble le plus abondant suivi de l'acide synergique, l'acide protocatechique et l'acide géntisique ; les flavonoides dont la diosmine est présent par une plus forte concentration suivie par la morine; ainsi que des coumarines et les alcaloides. Ces composés exercent un effet anti-inflammatoire via la réduction de la surproduction des médiateurs inflammatoires impliqués dans la réaction inflammatoire. Il est rapporté que la morine est capable de réduire l'activité des MPO et NO [45], et par conséquent provoque une diminution de l'influx des neutrophiles dans les tissus enflammés.

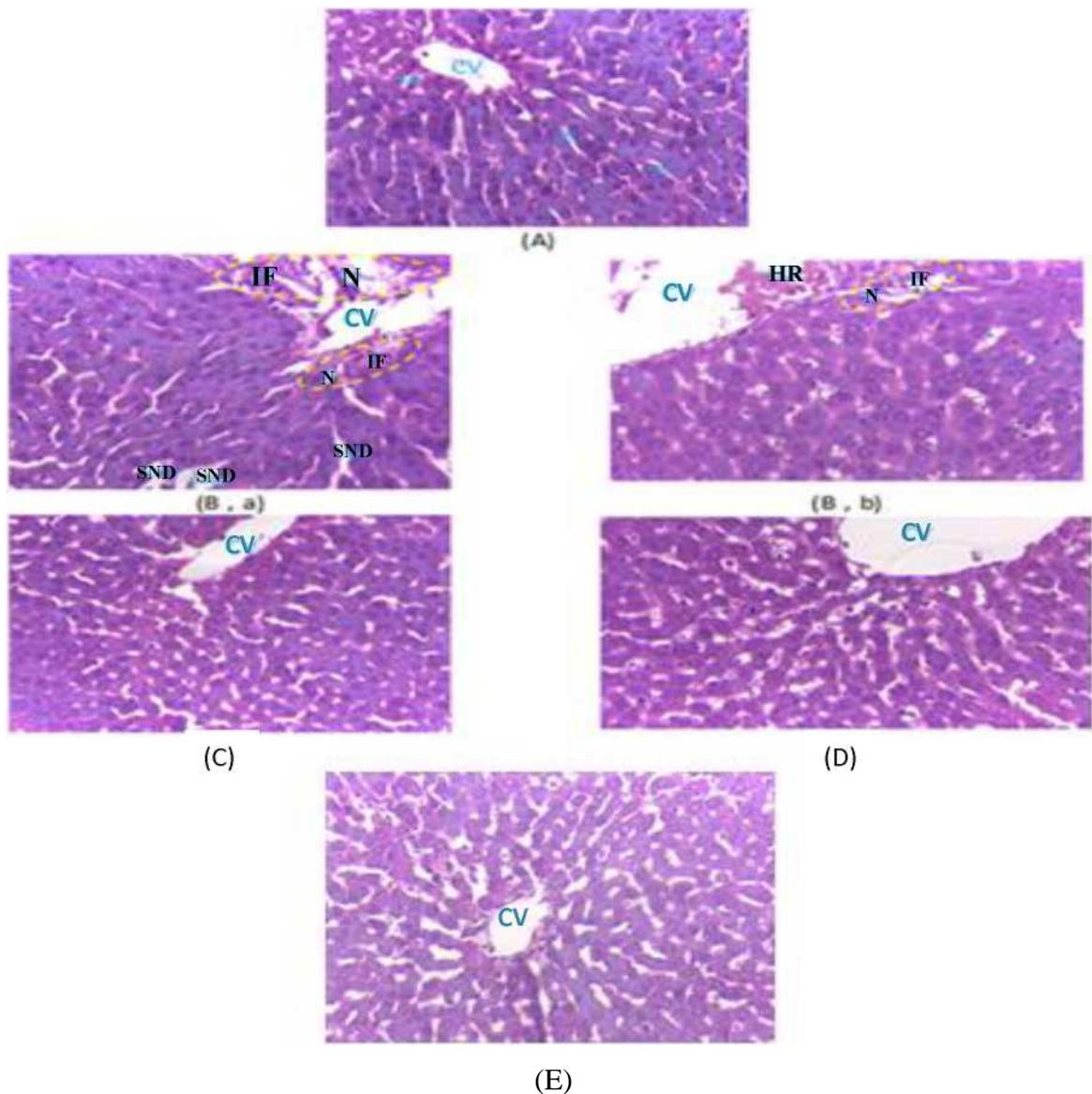
### Conclusion

*L'analyse de l'extrait n-BuOH de H.undulatum des tiges par HPLC/DAD a montré la présence des phytoconstituants qui possèdent des propriétés anti-inflammatoire très importantes dont leur mise en évidence est effectuée en utilisant différents tests in vitro (dénaturation de l'albumine, HRBC, NO scavenger, l'œdème induits par la carragénine), et in vivo (modulation des protéines carbonyles hépatiques, du MPO, NO, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ ).*

### 2.2.3. L'évaluation histopathologique

La figure (5.24) montre des photomicrographies du profil histopathologique des sections hépatiques des rats traités par l'hydrazine et les extraits BEHUL BEHUS et qui confirment les résultats obtenus précédemment.

Chez les rats traités par l'hydrazine, le foie présente une dégénérescence cellulaire, avec une perte de sa configuration ; comprenant également une dilatation des vaisseaux sanguins, une congestion dans les lobules, certains foyers hémorragiques coagulant dans le parenchyme hépatique et une infiltration des cellules inflammatoires mixtes autour des hépatocytes nécrotiques. Chez les rats traités avec les extraits BEHUS et BEHUL (200 mg/kg) nous avons observé que l'architecture hépatique a montré une légère dégénérescence avec un degré modéré d'altération histopathologique illustrée. Un degré réduit des dilatations des veines sinusoidales et centrales, un léger ballonnement et nécrose des hépatocytes ont été remarqués et une infiltration cellulaire inflammatoire minime, une légère nécrose des hépatocytes a été remarquée.



**Figure 5.24 : Micrographe de l'examen histopathologique (H & E x 40).**

**A.** Contrôle : hépatocytes normaux avec des espaces sinusoidaux (SN) veines centrales (CV) et des trépieds portes périphériques.

**B.** rats traités par HD : l'architecture hépatique a été perturbé par une perte de cordons hépatiques d'agencement radial et dilatations sinusoidales marqués (SND), le degré sévère d'hémorragies (HR) et la veine centrale est dilatée, la nécrose centro-lobulaire (N) à une dégénérescence vacuolaire et l'infiltration de cellule inflammatoire (IF), (figures 5.24 ; Ba, Bb).

**C.** rats traités par HD +BEHUL : l'architecture hépatique a montré une légère dégénérescence avec un degré modéré d'altération histopathologique illustrée. Un degré réduit des dilatations des veines sinusoidales et centrales, un léger ballonnement et nécrose des hépatocytes ont été remarqués.

**D.** rats traites par HD + Vit E : les changements histopathologiques sont moins sévère.

L'architecture hépatique a été préservée et a montré un cordon d'hépatocyte réguliers, une infiltration cellulaire inflammatoire minimale, la veine centrale est moins congestionnée.

E. rats traités par HD + BEHUS : l'architecture hépatique a montré une légère dégénérescence. La dilatation des veines sinusoidales et centrales a été réduite, une infiltration cellulaire inflammatoire minime, une légère nécrose des hépatocytes a été remarquée.

### Références bibliographiques

- [1] Marcocci, Marguire J J, Droy-lefaiz M T, Packer L. The nitric oxide scavenging properties of Ginkgo biloba extract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994; 201: 748-755.
- [2] Jitpisute Chunthorng-Orn, Bhanuz Dechayont, Pathompong Phuaklee, Onmanee Prajuabjinda, Thana Juckmeta, Arunporn Itharat. Cytotoxic and antioxidant activities of *Antidesma thwaitesianum* Mull Arg (Euphorbiaceae) fruit and fruit waste extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2015; 14(4):627.
- [3] Naseem N, Qureshia Bhanudansh S.Kuchekarb Nadeem A.LogadeaMajid A.Haleema. Antioxidant and hepatoprotective activity of *Cordia macleodii* leaves. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2009; 17(4): 299-302.
- [4] Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*, 1999;65(4):337-53.
- [5] Marletta MA. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem Sci*, 1989; 14 (12): 488-492.
- [6] David S B. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res*, 1999; 31 (6): 577-596.
- [7] Moncada S, Palmer R M Jr, Higgs E A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol*, 1989; 38: 1709-1715.
- [8] Virginia H, Sarah L E, Rachel J S, Nathaniel T, Joseph S, Adam E, Cecilia G. Mitochondrial nitric-oxide synthase: role in pathophysiology. *IUBMB Life*, 2003; 55 (10 &11): 599-603.
- [9] Abel El-Gazzar , Abbas El-Ghamery, AlBaraa El-Saied Computer-generated keys to the flora of Egypt. The Boraginaceae, *Annals of Agricultural Science*, 2015; 60(1): 67-85.
- [10] Vane JR, Botting RM . New insights into the mode of action of anti inflammatory drugs. *Inflamm Res*, 1995; 44(1):1-10.
- [11] Vane JR, Botting RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflammation Research*, 1998; 47(2): 78–87.
- [12] Mizushima, Y., 1966. Screening test for anti-rheumatic drugs. *Lancet*, 1966; 2: 443.
- [13] Rajendran Vadivu, K. S. Lakshmi In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchinensis* (Lour) Moore ssp *laurina*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 2008; 3(2): 121-124.
- [14] Grant N H, Alburn, H E and Kryzanasuskas C. Stabilization of serum albumin by anti-inflammatory drugs. *Biochemical pharmacology*, 1970; 19(3): 715-722.

- [15] Habibur Rahman, M. Chinna Eswaraiah and A M. Dutta .In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of *Oryza sativa* Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 15 (1): 115-121, 2015
- [16] Dharmeshkumar Prajapati, N. M. Patel .In Vitro Anti-arthritic activity of *Tecoma stans* (Linn.) Leaves Algerian journal of natural product Vol 3, No 2 (2015)
- [17] Shazia Tantary , Akbar Masood , Aashiq Hussain Bhat , Khalid Bashir Dar, Mohammad Afzal Zargar, Showkat Ahmad Ganie1.In vitro Antioxidant and RBC membrane Stabilization Activity of *Euphorbia wallichii* Free Radicals and Antioxidants, 2017; 7(1): 13-22.
- [18] Chippada SC, Volluri SS,Bammidi SR,Vangalapati M. In vitro anti-inflammatoryactivity of methanolicextractof*CentellaasiaticabyHRBCmembranestabilisation*.*RasayanJChem*, 2011; 4:457-460.
- [19] Chatter Riahi R, Tarhouni S, Kharrat R. Criblage de l'effet anti-inflammatoire et analgésique des algues marines de la mer méditerranée. *Unité de Toxines Alimentaire, Archs. Inst. Pasteur Tu n i s*, 2011, 88 (1-4).
- [20] Huang GJ, Huang SS, Lin SS, Shao YY, Chen CC, Hou WC, Kuo YH. “Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of ergostatrien-3 $\beta$ -ol from *Antrodia camphorata* submerged whole broth in mice”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010; 23; 58(12):7445-52.
- [21] Spector W G and Willoughb D A. “The inflammatory response” .*Bacteriological Reviews*, 1963; 27(2): 117-154.
- [22] Salvemini D, Wang Z Q, Bourdon D M.,Stern M K, Currie M G, and Manning P T. “Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema,” *European Journal of Pharmacology*, 1996; 303(3): 217-220.
- [23] Sungwon Lee, Seulmee Shin, Hyunyul Kim, Shinha Han, Kwanghee Kim, Jeunghak Kwon, Jin-hwan K. Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF- $\kappa$ B pathways. *J Inflamm (Lond)*, 2011; 8: 16.
- [24] Ghedira K. Les flavonoides :structure,proprietes biologiques role prophylactique et emplois en therapeutique. *Phytotherapie*, 2005 ; 3(4) :162-196.
- [25] Collin S and Crouzet J. *Polyphenols et procedés* .Lavoisier, 2011 : ISBN 978-2-7430-1338-7
- [26] Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 2000; 52(4):673-751.
- [27] K. J. Yun, J. Y. Kim, J. B. Kim et al., “Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by Asiatic acid via NF- $\kappa$ B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible

involvement of the IKK and MAPK pathways,” *International Immunopharmacology*, 2008; 8(3): 431-441.

[28] Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 1997; 272(33):20313–6.

[29] Alessandra C, Jennifer D, Chava P, and D. Allan Butterfield .Protein Carbonyl Levels An Assessment of Protein Oxidation ; *Methods in Pharmacology and Toxicology* . Humana Press Inc., Totowa, NJ, 161-176.

[30] Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2003;329(1–2):23–38.

[31] Hoedemakers RMJ, Atmosoerodjo-Briggs JE, Morselt HWM, Daemen T, Scherphof GL, Hardonk MJ. Histochemical and electron microscopic characterization of hepatic macrophage subfractions isolated from normal and liposomal muramyl dipeptide treated rats. *Liver*, 1995; 15:113–120.

[32] Howard D, McCalden TA, Billings RE .myeloperoxidase activity in liver. *Life Sci. The determination of myeloperoxidase activity in liver*, 1990; 47(24): 145-50.

[33] Lehnert A, Lange S, Niemann G, Rosendahl A, MeyerSchwesinger C, Oh J, et al. Myeloperoxidase deficiency .ameliorates progression of chronic kidney disease in mice, 2014 ; 307: 407–417.

[34] Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Méd. Vét*, 2003; 147: 79-93.

[35] Shetty S, Kumari S, Madhu L. Variations in serum myeloperoxidase levels with respect to hyperglycemia, duration of diabetes, BMI, sex and aging in type 2 diabetes mellitus. *Int J Res Pharm Biomed Sci*, 2012; 3(2):652-5.

[36] Deby-Dupont C. Deby M. Lamy. Neutrophil myeloperoxidase revisited: it's role in health and disease *ntensivmedizin und Notfallmedizin*, 1999; 36(6):500–513.

[37] Sander S, Rensen, Yanti Slaats, Jeroen Nijhuis, Anneke J, Veerle B, Driessen A, Ernst M, Willem J G, and Wim A. Buurma nIncreased Hepatic Myeloperoxidase Activity in Obese Subjects with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Am J Pathol*, 2009; 175(4): 1473–1482.

[38] ehman MU, Sultana S. Attenuation of oxidative stress, inflammation and early markers of tumor promotion by caffeic acid in Fe-NTA exposed kidneys of Wistar rats. *Mol Cell Biochem*, 2011; 357(1-2):115-2.

[39] Maiocchi S, Rees M, Shane T. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015; 86(1): 29.

- [40] Garça MF, Aslan M, Tuna B, Kozan A, Cankaya H. Serum myeloperoxidase activity, total antioxidant capacity and nitric oxide levels in patients with chronic otitis media. *J Membr Biol*, 2013; 247:519-24.
- [41] Mohsen Minaiyan, Gholamreza Asghari, Hassan Sadraei, and Edris Feili. Anti-inflammatory effect of *Pycnocyclus spinosa* extract and its component isoacetovanillone on acetic acid induced colitis in rats. *Res Pharm Sci*, 2015; 10(4): 345–355.
- [42] Bachoual R, Talmoudi W, Boussetta T, Braut F, El-Benna J. An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice. *Food Chem Toxicol*, 2011; 49(6):1224-8.
- [43] Patel A M, Patel P K, and Manish B. Effects of ethanol extract of *Ficus bengalensis* (bark) on inflammatory bowel disease. *Indian J Pharmacol*, 2010 ; 42(4): 214–218.
- [44] Oday O Hamiza , Sultana S. Methanolic extract of *Terminalia chebula* protects against DMH induced colon damage in Wistar rats by restoring antioxidant enzyme activities and suppressing inflammation. *Int. J. Drug Dev. & Res*, 2014; 6 (1): 54-6.
- [45] Vibha Singh. Medicinal plants and bone healing. *Natl J Maxillofac Surg*. 2017; 8(1): 4–11.
- [46] Fermin SD, Julio G, Jose AR, Antonio Z. Effect of Quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996; 278: 771–9.
- [47] Ramadori G, Armbrust T. Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2001; 13:777–784.
- [48] Noah T. Ashley, Zachary M. Weil, and Randy J. Nelson. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*, 2012; 43:385–406.
- [49] Cong-Qiu Chu. How much have we learnt about the TNF family of cytokines. *Cytokine*, (2018); 101: 1–3.
- [50] Pal S, Yadav P, Sainis K B, Shankar B S. TNF- $\alpha$  and IGF-1 differentially modulate ionizing radiation responses of lung cancer cell lines. *Cytokine*, 2016; 101: 89–98.
- [51] Emad M. El-Omar, Mary Carrington, Wong-Ho Chow, Kenneth E. L. McColl , Jay H. Breamk, Howard A. Youngk, Jesus Herrera, Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer, 2000; 404(6776):398-402.
- [52] Yuehong Chen, Marcia Friedman, Gang Liu, Atul Deodhar, Cong-Qiu Chu. Do tumor necrosis factor inhibitors increase cancer risk in patients with chronic immune-mediated inflammatory disorders? , 2018; 101:78-88.
- [53] Panel BL, Fiebich BL, Fiebich DM, Heinrich BK, Hiller N, Kammerer R. Inhibition of TNF- $\alpha$  synthesis in LPS-stimulated primary human monocytes by *Harpagophytum* extract SteiHap 69. *Phytomedicine*, 2001; 8(1): 28-30.

[54] Nasrin Ziamajidia b, Abolfazl Nasiria. Effects of garlic extract on TNF- $\alpha$  expression and oxidative stress status in the kidneys of rats with STZ  $\beta$  nicotinamide-induced diabetes. *Pharmaceutical biology*, 2017; 55(1): 526–531.

[55] Pandey K B, Rizvi S I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009; 2(5): 270–278.

[56] Ghedira K. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 2005 ; 3(4) :162-169.

[57] Hanáková Z, Hošek J, Kutil Z, Temml V, Landa P, Vaněk T, Schuster D, Dall'Acqua S, Cvačka J, Polanský O, Šmejkal K. Anti-inflammatory Activity of Natural Geranylated Flavonoids: Cyclooxygenase and Lipoxygenase Inhibitory Properties and Proteomic Analysis. *J Nat Prod*, 2017; 80(4): 999-1006.

## Conclusion générale et perspectives

Les résultats des différentes études précédentes indiquent l'existence d'une multitude de mécanismes antioxydants et anti-inflammatoires simultanés caractérisant la plante *Heliotropium undulatum* qui existe dans le Sahara Algérien et, différents mécanismes impliqués dans la modulation du dysfonctionnement mitochondrial/microsomal et l'inflammation induite par l'hydrazine.

L'activité antioxydante *in vitro* prouvée est manifestée par une grande variété d'action, telle, l'activité de piégeage de radical DPPH, l'activité de piégeage de radical hydroxyle ( $^{\circ}\text{OH}$ ), la chélation des métaux de transition, ainsi que le pouvoir réducteur indiquent que les métabolites secondaires dont les plus intéressants sont les polyphénols contribuent en grande partie aux activités antioxydantes de l'espèce *Heliotropium undulatum* notamment la fraction feuilles.

Les deux extraits n-BuOH, BEHUS et BEHUL à 200 mg/Kg ont préservé la fonction hépatique en modulant la CYP2E1 et en neutralisant le stress oxydant hépatique et restaurant le dysfonctionnement mitochondrial en assurant une protection du statut redox intra mitochondrial issu durant le traitement par l'hydrazine (300 mg/Kg) à un degré comparable à celui de la vitamine E. L'extrait BEHUL est le plus marquant comparativement à l'extrait BEHUS ; cet effet est proportionnel à la nature qualitative et quantitative des deux fractions.

Par ailleurs l'extrait BEHUS à 200 mg/Kg a limité considérablement les altérations inflammatoires induites par l'hydrazine (300 mg/Kg) en modulant les protéines carbonyles hépatiques, les taux de MPO, de NO, l'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$ . Cet effet pourrait être dû aux phytoconstituants qu'il possède. Les propriétés anti-inflammatoires très importantes dont leur mise en évidence est effectuée en utilisant différents tests *in vitro* (dénaturation de l'albumine, HRBC, NO scavenger, l'œdème induits par la carragénine).

Nos résultats indiquent que les différents mécanismes impliqués par les deux extraits BEHUS et BEHUL dans la modulation du dysfonctionnement mitochondrial/microsomal et de l'inflammation induite par l'hydrazine pourraient être proportionnels à la nature qualitative et quantitative des phytoconstituants de ces deux extraits révélés par les analyses phytochimiques : CCM, et HPLC-MASS.

Au regard de ces activités phytochimiques et biologiques intéressantes réalisées sur la plante *H. undulatum*, il convient de mener d'autres investigations et d'ouvrir plusieurs perspectives et faisant appel aux autres disciplines résumé dans ce qui suit :

- Purification et identification des principes bioactifs actifs la plante *H.undulatum*,
- Des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des principes actifs seraient utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.
- Etudier d'autres interactions ciblant l'aspect moléculaire.

Année universitaire : 2017/2018	Présentée par : DEFFA Ouafa
<p style="text-align: center;"><b>Intitulé</b></p> <p style="text-align: center;">Les interactions fonctionnelles des flavonoïdes de l'extrait butanolique de la plante <i>Heliotropium undulatum</i> vis-à-vis des mécanismes de l'hépatotoxicité de l'hydrazine chez le rat</p>	
<p style="text-align: center;"><b>Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat</b></p>	
<p><b>Résumé</b></p> <p>Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la valorisation de la partie aérienne d'une plante endémique collectée du Sahara algérien, <i>Heliotropium undulatum</i> Vahl (la famille des Boraginacées). Cette étude a été réalisée dans le cadre d'évaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des extraits n-BuOH des tiges et des feuilles de <i>H. undulatum</i> en utilisant un model rat-hydrazine. Les études <i>in vitro</i> (DPPH°, Chélation, FRAP, °OH) révèlent que l'extrait n-BuOH des feuilles est doté d'une propriété antioxydante. Les études <i>in vivo</i> également ont montré que l'extrait n-BuOH des feuilles à 200 mg/Kg a prouvé une activité hépatoprotectrice en préservant la fonction hépatique, en modulant la CYP2E1, en neutralisant le stress oxydant hépatique, et en assurant une protection de statut redox intra-mitochondrial manifesté durant le traitement par le l'hydrazine (300 mg/Kg). L'activité anti-inflammatoire s'est mieux prononcée par l'extrait n-BuOH des tiges dont la mise en évidence est effectuée en utilisant différents tests <i>in vitro</i> (dénaturation de l'albumine, HRBC, NO° scavenger). L'étude des voies modulatrices (les protéines carbonyles hépatiques, de MPO, les taux des NO, de l'IL-1β et de TNF-α) a confirmé le potentiel anti-inflammatoire <i>in vivo</i> de l'extrait n-BuOH des tiges. L'ensemble des mécanismes antioxydants et anti-inflammatoires concomitants caractérisant les deux extraits d'<i>Heliotropium undulatum</i> est corrélé à la nature qualitative et quantitative des acides phénoliques et des flavonoïdes révélés via l'analyse par l'HPLC-MASS et à l'effet synergétique de tous les phytoconstituants qui renferme cette plante.</p>	
<p><b>Mots Clés :</b> <i>Heliotropium undulatum</i>, Hydrazine, Foie Stress oxydant, Inflammation, Cyp2E1, Mitochondrie, HPLC/MS.</p>	
<p><b>Laboratoire de recherche :</b></p>	
<p>Laboratoire de biologie et Environnement : Université des Frères Mentouri, Constantine, Algérie</p>	
<p><b>Président:</b> Pr. KHELIFI-TOUHAMI Fatima.  <b>Directrice:</b> Pr. AMMEDAH Souad  <b>Co-Directeur:</b> Pr. MEKKIOU Ratiba  <b>Examineurs:</b> Pr. HAMBABA Leila</p>	<p>Université des Frères Mentouri Constantine1  Université des Frères Mentouri Constantine1  Université des Frères Mentouri Constantine1  Université Ben Boulaid Batna 2</p>
<p>Pr. BOURICHE Hamama</p>	<p>Université Abbas Ferhat Sétif 1</p>
<p>Pr. DAHAMNA Saliha</p>	<p>Université Abbas Ferhat Sétif 1</p>