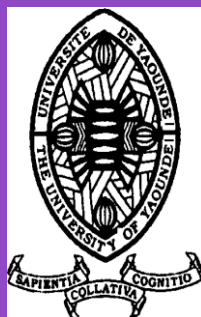


UNIVERSITE DE YAOUNDE I

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT



CENTRE FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES IN
LIFE, HEALTH AND ENVIRONMENTAL
SCIENCES

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE

RESEARCH AND DOCTORATE
TRAINING UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET DE TOXICOLOGIE
LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

**Propriétés anti-hépatotoxiques et antivirales
(virus de l'hépatite C) de l'extrait aqueux de
Desmodium adscendens (Fabaceae) et son effet sur
la différenciation des cellules souches en
hépatocytes**

THESE

Présentée et soutenue comme requis partiel en vue de l'obtention du **Doctorat/PhD**
en **Biochimie**

Spécialité: Pharmacologie Moléculaire / Toxicologie

Par

CHUISSEU DJAMEN Diéudonné Pascal

Matricule 92R888
Doctorat 3^{ème} Cycle



Devant le Jury composé de

Président : **FEKAM BOYOM Fabrice**, Professeur, Université de Yaoundé I
Rapporteur : **MOUNDIPA FEWOU Paul**, Professeur, Université de Yaoundé I
Membres : **MBACHAM FON Wilfred**, Professeur, Université de Yaoundé I
AGBOR Gabriel AGBOR, Directeur de Recherche, IMPM, Yaoundé
NJAYOU Frédéric Nico, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I

Année Académique : 2019-2020

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

CENTRE FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES IN
LIFE, HEALTH AND ENVIRONMENTAL
SCIENCES

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE

RESEARCH AND DOCTORATE
TRAINING UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY



DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET DE TOXICOLOGIE
LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

**Propriétés anti-hépatotoxiques et antivirales
(virus de l'hépatite C) de l'extrait aqueux de
Desmodium adscendens (Fabaceae) et son effet sur
la différenciation des cellules souches en
hépatocytes**

THESE

Présentée et soutenue comme requis partiel en vue de l'obtention du **Doctorat/PhD**
en Biochimie

Spécialité: Pharmacologie Moléculaire / Toxicologie

Par

CHUISSEU DJAMEN Dieudonné Pascal

Matricule 92R888

Doctorat 3^{ème} Cycle

Devant le Jury composé de

Président : **FEKAM BOYOM Fabrice**, Professeur, Université de Yaoundé I
Rapporteur : **MOUNDIPA FEWOU Paul**, Professeur, Université de Yaoundé I
Membres : **MBACHAM FON Wilfred**, Professeur, Université de Yaoundé I
AGBOR Gabriel AGBOR, Directeur de Recherche, IMPM, Yaoundé
NJAYOU Frédéric Nico, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I

Année Académique : 2019-2020

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE DE
LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE EN SCIENCE DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH
AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

RESEARCH DOCTORATE TRAINING UNIT
IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, **Pr. FEKAM BOYOM Fabrice** et **Dr AGBOR Gabriel AGBOR** respectivement Président et Examineur du jury de Thèse de Doctorat/PhD en Biochimie, spécialité Pharmacologie Moléculaire / Toxicologie, soutenue par **Dr CHUISSEU DJAMEN Dieudonné Pascal** (Matricule: **92R888**) le 17 décembre 2020 à 10h dans la salle S01/02 Extension de la Faculté de Sciences de l'Université de Yaoundé I sur le thème intitulée «Propriétés anti-hépatotoxiques et antivirales (virus de l'hépatite C) de l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* (Fabaceae) et son effet sur la différenciation des cellules souches en hépatocytes» attestons que la candidate a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

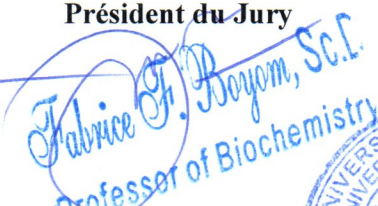
Fait à Yaoundé, le **12.5 MARS 2021**.....

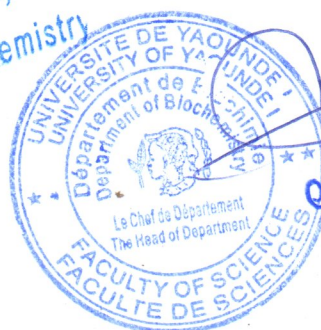
Examineur

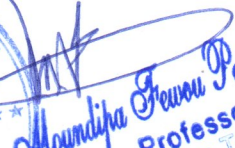
Président du Jury

Le Chef de Département


Gabriel A. Agbor, PhD
Directeur de Recherche


Fabrice F. Boyom, Sc.I.
Professor of Biochemistry




Moundipa Feven Paul
Professor
Enzymology Toxicology

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I
ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020

(Par Département et par Grade)

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maitre de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA : ATCHADE Alex, *Professeur*

VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

Chef de Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*

Chef de Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR :
MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)
--

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste

14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
22	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
25	DJUWKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	VICE-DOYEN / DSSE
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département

3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>
14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste

36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste
44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste

16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
17	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (35)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice Recteur Univ, Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste

6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef deDepartement</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
23	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUNBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
15	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
25	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
33	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
34	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
35	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NKENGFAK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste
8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UJI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service Programme & Diplomes</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UJI</i>

23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
33	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste
34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste

16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (31)
--

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>CD Info/ Inspecteur MINESUP</i>
2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste

17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
28	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
29	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
30	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
31	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste

15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE (PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Chef Division. UN</i>
3	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
4	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
9	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
10	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
11	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
12	WOAFO Paul	Professeur	En poste
13	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
15	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste

24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MEL'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste
38	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)
--

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>

10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (06)	3 (2)	39 (18)
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	46 (14)
BPV	06 (0)	11 (02)	9 (06)	07 (01)	33 (9)
CI	10 (1)	10 (02)	12 (02)	03 (0)	35 (5)
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	02 (0)	35(7)
IN	2 (0)	1 (0)	13 (01)	09 (01)	25 (2)
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	06 (02)	31 (3)
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	18 (5)
PHY	12 (0)	15 (02)	10 (03)	03 (0)	40 (5)
ST	8 (1)	14 (01)	19 (05)	02 (0)	43(7)
Total	69 (4)	100 (28)	130 (33)	46 (10)	345 (75)

Soit un total de **345 (75)** dont:

- Professeurs **68 (4)**
- Maîtres de Conférences **101 (28)**
- Chargés de Cours **130 (33)**
- Assistants **46 (10)**

() = Nombre de Femmes **75**

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A mes parents (im) Jacques DJAMEN, Cathérine YANDO et Hélène TCHAKOUNTE,

A mes frères et sœurs, ma famille, ma belle-famille, mes enfants et

A ma tendre et douce Alida FANNANG WANTIEP, épouse CHUISSEU

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé grâce au soutien des personnes et des institutions. Je voudrais utiliser les lignes qui suivent pour leur adresser mes sincères remerciements.

Je pense :

Au Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul, mon directeur de Thèse, Chef de Département de Biochimie et Chef du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de l'Université de Yaoundé I. Il n'a cessé de me faire bénéficier et ce depuis le cycle de Maîtrise, de son expérience et sa rigueur scientifique, de son esprit d'initiative et sa persévérance dans le travail. La grande disponibilité qui le caractérise a permis qu'il suive dans le temps ce travail : qu'il soit rassuré de ma profonde reconnaissance.

A tous le corps enseignant du Département de Biochimie de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I pour la formation académique reçue et les suggestions apportées à ce travail.

A tous les personnels enseignant et administratif de l'Université des Montagnes sous la conduite du Président du Conseil d'Administration, le Pr Lazare KAPTUE pour l'encadrement institutionnel

A tous les membres du Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie pour les multiples contributions pendant la réalisation de ce travail et lors des séminaires de laboratoire.

A toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail et dont les noms n'ont pas été cités. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude

TABLE DE MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTÉ DES SCIENCES	i
DEDICACES	xv
REMERCIEMENTS	xvi
TABLE DE MATIERES.....	xvii
LISTE DES ABBREVIATIONS ET ACRONYMES	xxvi
LISTE DES TABLEAUX.....	xxvii
LISTE DES FIGURES.....	xxviii
RESUME.....	xxxï
ABSTRACT	xxxii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
1. Introduction	1
2. Hypothèse de Recherche	3
3. Objectifs.....	3
3.1. Objectif général	3
3.2. Objectifs Spécifiques	3
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	5
1.1. Généralités sur le foie.....	5
1.1.1. Anatomie et histologie du foie	5
1.1.1.1. Anatomie et vascularisation du foie	5
1.1.1.2. Histologie du foie	7
1.1.1.2.1. Les hépatocytes ou cellules parenchymateuses.....	7
1.1.1.2.2. Les cellules non parenchymateuses.....	8
1.1.1.2.2.1. Les cellules endothéliales de la sinusoire	8
1.1.1.2.2.2. Les cellules de Kupffer	8
1.1.1.2.2.3. Les cellules périsinusoïdales ou cellules étoilées (cellules de Ito).....	8
1.1.1.2.2.4. Les cellules à granulation ou « <i>pit cells</i> »	9

1.1.1.2.2.5. Les cellules épithéliales : les cholangiocytes	9
1.1.2. Les fonctions du foie	9
1.2. Développement du foie	10
1.2.1. Développement embryonnaire du foie	10
1.2.2. Différenciation des hépatocytes et des cellules épithéliales biliaires.....	11
1.2.2.1. Différenciation hépatocytaire	12
1.2.2.2. Différenciation des cellules épithéliales biliaires (CEB)	12
1.3. Cellules souches	13
1.3.1. Cellules souches embryonnaires du foie	14
1.3.2. Régénération et cellules souches hépatiques adultes.....	14
1.3.3. Fabrication du foie à partir de cellules souches embryonnaires (CSE).....	15
1.4. Anomalies fonctionnelles et maladies du foie.....	16
1.4.1. Les anomalies fonctionnelles du foie	16
1.4.1.1. Le syndrome de cholestase.....	16
1.4.1.2. Les lésions hépatocytaires	17
1.4.1.3. Le syndrome hépatoprive ou syndrome d'insuffisance hépatocellulaire	17
1.4.1.4. Le syndrome inflammatoire	17
1.4.2. Les maladies du foie.....	17
1.4.2.1. Les hépatites virales	18
1.4.2.1.1. Généralités sur les hépatites virales	18
1.4.2.1.2. Cas spécifique du Virus de l'hépatite virale C (HVC).....	18
1.4.2.1.2.1. Généralités sur le VHC	18
1.4.2.1.2.2. Génome du VHC et principales fonctions de ses protéines	19
1.4.2.1.2.3. Cycle viral du VHC	20
1.4.2.2. Les hépatites toxiques	22
1.5. Mécanismes généraux de dommage cellulaire	22
1.6. Méthodes expérimentales d'induction des hépatites toxiques	25

1.6.1. Mécanisme moléculaire d'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone.....	25
1.6.2. Mécanisme moléculaire d'hépatotoxicité induite par le paracétamol	26
1.6.3. Protocoles expérimentaux	28
1.7. Modèles expérimentaux d'étude du virus de l'hépatite C	28
1.7.1. Les réplicons subgénomiques.....	29
1.7.2. Système HCVcc ou particules virales infectieuses produites en culture cellulaire.....	30
1.8. Mécanismes de défense contre les oxydations et traitement des hépatopathies.....	32
1.8.1. Mécanisme généraux de défense contre les oxydations	32
1.8.1.1. Défense par l'intermédiaire des enzymes.....	32
1.8.1.2. Les antioxydants.....	34
1.8.2. Traitement des hépatites et des autres hépatopathies	35
1.8.2.1. Médecine moderne	35
1.8.2.1.1. Traitement de quelques syndromes	35
1.8.2.1.2. Traitement des hépatites toxiques	35
1.8.2.1.3. Traitement de l'hépatite virale C.....	36
1.8.2.2. Médecine traditionnelle.....	37
1.9. Présentation de la plante médicinale investiguée (<i>Desmodium adscendens</i>) et des travaux antérieurs	40
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	43
2.1. Matériel.....	43
2.1.1. Le matériel végétal	43
2.1.2. Les animaux d'expériences	43
2.1.3. La lignée cellulaire Huh-7	43
2.1.4. Les systèmes réplicons subgénomiques LucUbiNeo-ET	43
2.1.5. Les particules virales : les HCVcc (virus infectieux produits en culture cellulaire) .	44
2.2. Méthodes	44
2.2.1. Préparation des extraits.....	44

2.2.2.	Evaluation <i>in vitro</i> des propriétés antioxydantes des extraits de <i>D. adscendens</i>	44
2.2.2.1.	Activités antiradicalaires des extraits de plantes par les tests de piégeage des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et hydroxyles (HO ⁻);	44
2.2.2.1.1.	Piégeage du radical DPPH ^o	44
2.2.2.1.2.	Activité de piégeage du radical OH ^o	45
2.2.2.2.	Activités réductrices des extraits de plantes par les tests de réduction du ferricyanure de potassium et molybdate	46
2.2.2.2.1.	Réduction du ferricyanure de potassium	46
2.2.2.2.2.	Réduction du molybdate.....	46
2.2.2.3.	Activité d'inhibition de la peroxydation lipidique	47
2.2.2.3.1.	Préparation de l'homogénat.....	47
2.2.2.3.2.	Test d'inhibition de la peroxydation lipidique dans l'homogénat de foie de rats	47
2.2.3.	Evaluation <i>in vitro</i> des propriétés antihépatotoxiques des extraits aqueux de <i>D. adscendens</i>	48
2.2.3.1.	Isolement des hépatocytes primaires et test de viabilité	48
2.2.3.1.1.	Isolement des hépatocytes de rat	48
2.2.3.1.2.	Test de viabilité cellulaire au Bleu Trypan	48
2.2.3.2.	Effet du temps sur la viabilité des cellules	49
2.2.3.3.	Effets des extraits de <i>D. adscendens</i> sur la viabilité des hépatocytes	50
2.2.3.4.	Recherche de la dose cytotoxique médiane du CCl ₄ à utiliser.....	50
2.2.3.5.	Evaluation de l'effet des extraits de <i>D. adscendens</i> contre l'hépatotoxicité induite par le carbone tétrachlorure (CCl ₄)	50
2.2.3.5.1.	Etude dose-réponse des activités hépatoprotecteurs et hépatocurateurs des extraits de <i>D. adscendens</i>	51
2.2.3.5.1.1.	Tests hépatoprotecteurs	51
2.2.3.5.1.2.	Tests hépatocurateurs	51
2.2.3.6.	Analyses biochimiques.....	51
2.2.3.6.1.	Test de viabilité des hépatocytes au MTT.....	52

2.2.3.6.2. Détermination de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT)	52
2.2.3.6.3. Détermination du taux de dialdéhyde malonique (MDA).....	54
2.2.4. Evaluation <i>in vitro</i> des extraits de <i>D. adscendens</i> sur les réplicons subgénomiques de génotype 1b du Virus de l'hépatite C (VHC)	55
2.2.4.1. Traitement.....	55
2.2.4.2. Test du gène rapporteur de la luciférase du VHC.....	56
2.2.4.3. Détermination du taux de protéines dans les lysats cellulaires	57
2.2.5. Évaluation de l'activité antivirale des extraits de <i>D. adscendens</i> sur le cycle infectieux du VHC.	58
2.2.5.1. Culture des cellules Huh7 et ensemencement en plaque de criblage à haut débit (HCS) de 96 puits.....	58
2.2.5.2. Préparation de la suspension virale	58
2.2.5.3. Tests antiviraux :	58
2.2.5.3.1. Effet sur le cycle viral complet	58
2.2.5.3.2. Quantification de l'infection par immunofluorescence indirecte	59
2.2.6. Evaluation <i>in vivo</i> de l'effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> vis-à-vis de l'hépatite induite par le tétrachlorure de carbone et le paracétamol.	61
2.2.6.1. Protocoles expérimentaux.....	61
2.2.6.1.1. Cas du tétrachlorure de carbone (CCl ₄).....	61
2.2.6.1.2. Cas du paracétamol	62
2.2.6.2. Sacrifice des animaux	63
2.2.6.3. Préparation du sérum	63
2.2.6.4. Préparation de l'homogénat hépatique	63
2.2.7. Dosage de quelques marqueurs biochimiques sériques de la fonction hépatique	63
2.2.7.1. Dosage colorimétrique des transaminases (ALAT et de ASAT)	63
2.2.7.2. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)	63
2.2.7.3. Dosage du malonedialdéhyde (MDA).....	64
2.2.7.4. Dosage des protéines sériques et hépatiques.....	64

2.2.8.	Dosages de quelques marqueurs enzymatiques du statut oxydant au niveau du foie	65
2.2.8.1.	Activité de la catalase (CAT)	65
2.2.8.2.	Activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)	66
2.2.8.3.	Détermination du taux du dialdéhyde malonique (MDA)	67
2.2.8.4.	Détermination du taux de du Glutathion	67
2.2.9.	Détection des marqueurs de la différenciation des cellules souches en hépatocytes : technique d'immunohistochimie/immunofluorescence	68
2.2.9.1.	Le montage	70
2.2.9.2.	Mesure de la fluorescence cellulaire en utilisant le logiciel <i>image J</i>	70
2.2.10.	Analyses statistiques	71
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION		72
3.1.	RESULTATS	72
3.1.1.	Le rendement d'extraction	72
3.1.2.	Propriétés antioxydantes des extraits et leurs effets anti-hépatotoxiques <i>in vitro</i> sur le modèle de toxicité induit sur des hépatocytes primaires de rats par le CCl ₄	72
3.1.2.1.	Propriétés antioxydantes	72
3.1.2.1.1.	Activités antiradicalaires	73
3.1.2.1.2.	Test de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	73
3.1.2.1.3.	Test de piégeage du radical hydroxyle (HO ⁻)	74
3.1.2.2.	Activités réductrices	74
3.1.2.2.1.	Réduction du ferricyanure de potassium	74
3.1.2.2.2.	Réduction du molybdate	75
3.1.2.2.3.	Activité d'inhibition de la peroxydation lipidique	76
3.1.3.	Effet anti-hépatotoxique des extraits aqueux de <i>D. adscendens</i> contre la toxicité induite par le CCl ₄ sur des hépatocytes de rats fraîchement isolés	77
3.1.3.1.	Rendement d'isolement et pourcentage de viabilité cellulaire	77
3.1.3.2.	Effet du temps sur la viabilité des hépatocytes	77
3.1.3.3.	Effet des extraits sur la viabilité des hépatocytes	79

3.1.3.4. Effet des concentrations variables du tétrachlorure de carbone sur la viabilité des hépatocytes : détermination de la concentration létale 50.....	80
3.1.3.5. Effets du pré-traitement avec <i>D. adscendens</i> avant induction de la toxicité par le CCl ₄ sur la viabilité hépatocytaire, l'activité de l'ALAT et le taux de MDA.....	80
3.1.3.6. Effets hépatoprotecteurs des extraits après induction de la toxicité par le CCl ₄ sur la viabilité hépatocytaire, l'activité de l'ALAT et le taux de MDA	82
3.1.4. Evaluations <i>in vitro</i> des effets de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur les réplicons subgénomiques de génotype 1b du Virus de l'hépatite C (VHC) et sur l'activité antivirale son cycle infectieux.....	84
3.1.4.1. Effets de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur les réplicons subgénomiques de génotype 1b du VHC.....	84
3.1.4.2. Effets de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur l'activité antivirale du cycle infectieux VHC	86
3.1.4.3. Conclusion partielle 1.....	88
3.1.5. Evaluation de l'effet hépatoprotecteur <i>in vivo</i> de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> vis-à-vis de l'hépatite induite par le tétrachlorure de carbone sur quelques paramètres de la fonction hépatique	89
3.1.5.1. Au niveau sérique.....	89
3.1.5.1.1. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité des transaminases	89
3.1.5.1.2. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de la phosphatase alcaline.....	91
3.1.5.1.3. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur le taux malondialdéhyde (MDA)	92
3.1.5.2. Au niveau hépatique.....	93
3.1.5.2.1. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de la superoxyde dismutase	93
3.1.5.2.2. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de la catalase (CAT)	94
3.1.5.2.3. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur le taux de glutathion (GSH)	95
3.1.5.2.4. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur le taux de malone dialdéhyde (MDA) hépatique	96
3.1.6. Evaluation de l'effet hépatoprotecteur <i>in vivo</i> de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> vis-à-vis de l'hépatite induite par le paracétamol sur quelques paramètres de la fonction du foie	97

3.1.6.1. Au niveau sérique.....	97
3.1.6.1.1. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité des transaminases	97
3.1.6.1.2. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de la phosphatase alcaline.....	99
3.1.6.1.3. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur le taux malondialdéhyde (MDA)	100
3.1.6.2. Au niveau hépatique.....	101
3.1.6.2.1. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de la superoxyde dismutase	101
3.1.6.2.2. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de la catalase (CAT)	102
3.1.6.2.3. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur le taux de glutathion (GSH).....	103
3.1.6.2.4. Effet de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur le taux malondialdéhyde (MDA)	104
3.1.7. Effets de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur l'expression des protéines du processus de différenciation et/ou de maturation hépatiques des rats intoxiqués au CCl ₄ ou au paracétamol: cas de la protéine SOX 17 (SOX17).....	105
3.1.8. Effets de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur l'expression des protéines du processus de différenciation et/ou de maturation hépatique via l'expression en fonction du temps du facteur Sox 17 par des rats intoxiqués au CCl ₄	108
3.1.9. Effets de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur l'expression des protéines du processus de différenciation et/ou de maturation hépatique via l'expression en fonction du temps du facteur Sox 17 par des rats intoxiqués au Paracétamol	111
3.1.10. Conclusion partielle 2.....	115
3.2. DISCUSSION	116
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	124
IV.1. CONCLUSION	124
IV.2. PERSPECTIVES	125
RÉFÉRENCES.....	126
Bibliographie.....	126
Webographie	147
ANNEXES	a

LISTE DES ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN :	Acide désoxiribonucléique
AFP :	Alpha Foetoprotéine
AGPI :	Acide Gras Polyinsaturé
ALAT:	Alanine aminotransferase
ANOVA :	Analysis de la Variance
APAP:	Acétyl-para-aminophénol
ARN :	Acide Ribonucléique
ASAT :	Aspartate aminotransférase
CAT:	Catalase
CCl₄ :	Tétrachlorure de carbone
CE50:	Concentration efficace 50
CK-19 :	Cytokeratin-19
CL50:	Concentration létale 50
CMC :	Carboxyméthyl cellulose
CYP2E1:	Cytochrome P450 2E1
DAA_s :	Antiviraux agissant directement sur le virus
EGCG :	Epigallocatechine-3-gallate
ERO:	Espèces oxygénées réactives
GP_x :	Glutathion peroxydase
GSH:	Glutathion réduit
GST:	Glutathion-S-transférase
HGF :	Facteur de Croissance hépatocytaire
NAPQI :	N-acétyl-para benzo-quinone imine
SOD:	Superoxide dismutase
SOX-17 :	Facteur de transcription SRY-Box 17
SRY :	Région déterminant le sexe Y
VHC:	Virus de l'hépatite C
VHCcc:	Particules virales infectieuses produites en culture cellulaire

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Plantes médicinales ayant un fort potentiel anti VHC	38
Tableau II : Composés chimiques ayant un potentiel anti VHC	39
Tableau III: Utilisation de <i>Desmodium adscendens</i> en Afrique et dans le monde	41
Tableau IV: Etalonnage du pyruvate de sodium	54
Tableau V: Réalisation de la courbe d'étalonnage pour le dosage de la catalase	66
Tableau VI: Procédure d'immunofluorescence.....	69
Tableau VII: Procédure de déshydratation avant le montage.....	70
Tableau VIII: Rendement d'extraction des plantes étudiées.....	72
Tableau IX: Rendement d'isolement et pourcentage de viabilité cellulaire	77

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique du foie et du lobule hépatique.....	6
Figure 2: Les différentes populations cellulaires hépatiques	9
Figure 3: La lignée de cellules hépatiques	10
Figure 4: Développement des lignages hépatiques	11
Figure 5: Hépatocytes et ségrégation de la lignée de l'épithélium biliaire.....	13
Figure 6: Différenciation hépatique in vitro à partir des cellules souches embryonnaires	16
Figure 7: Représentation schématique d'une particule de VHC	19
Figure 8: Organisation du génome viral du VHC	20
Figure 9: Cycle du virus de l'hépatite C	21
Figure 10: Formation des espèces réactives d'oxygène (ERO) et mécanisme de défense contre les dommages dues aux ERO	24
Figure 11: Biotransformation hépatique du tétrachlorure de carbone et initiation des dommages cellulaires	26
Figure 12: Métabolisme hépatique du paracétamol	27
Figure 13: Le système réplicon subgénomique du VHC	30
Figure 14: structure de quelques génomes dérivés de JFH-1	31
Figure 15: Relations entre les enzymes-oxydants et le glutathion.	33
Figure 16: Carte du réplicon subgénomique LucUbiNeo-ET	44
Figure 17: Chambre de Neubauer.....	49
Figure 18: Droite d'étalonnage du pyruvate de sodium.....	54
Figure 19: Schéma simplifié du criblage sur le système HCVcc	59
Figure 20: Courbe d'étalonnage pour le dosage de la catalase	66
Figure 21: Comparaison des activités de piégeage du DPPH par les extraits de plantes (DA1 et DA2) et l'acide ascorbique (vitamine C), appelés piégeurs de radicaux DPPH	73
Figure 22: Activités de piégeage des radicaux hydroxyles (OH°) des extraits de plantes (DA1 et DA2) et de la vitamine C.....	74
Figure 23: Réduction de la capacité des ions ferriques par DA1, DA2 et l'acide ascorbique..	75
Figure 24: Capacité antioxydante totale (réduction du molybdate) des extraits de plantes (DA1 et DA2) et de la vitamine C.....	76
Figure 25: Inhibition de la peroxydation lipidique par DA1, DA2 et l'acide ascorbique	76
Figure 26: Viabilité des hépatocytes en fonction du temps	78
Figure 27: Variation de l'activité de l'ALAT en fonction du temps.....	78

Figure 28: Effet d'extraits de plantes (DA1 et DA2) sur la viabilité cellulaire (a) et la libération d'ALAT (b).....	79
Figure 29: Baisse de la viabilité cellulaire (a) et augmentation de l'activité extracellulaire de l'ALAT (b) des hépatocytes intoxiqués au CCl ₄	80
Figure 30: Effet des extraits de DA1 et DA2 en prétraitement sur la viabilité des hépatocytes (a), la libération de l'ALAT (b) et l'oxydation de la membrane lipidique (c).....	81
Figure 31: Effet d'extraits de plantes (DA1 et DA2) en post-traitement sur la viabilité des hépatocytes (a), la libération de l'ALAT (b) et l'oxydation de la membrane lipidique	83
Figure 32: Pourcentage de viabilité des cellules (a) et inhibition de la réplication du VHC par l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> dans les cellules LucUbiNeo-ET (b).....	85
Figure 33: L'extrait de <i>D. adscendens</i> (DA) inhibe l'infection par HCVcc (a) et ne modifie pas le nombre relatif de noyaux cellulaires (b).....	87
Figure 34: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de l'ALAT un, quatre et cinq jours après administration du CCl ₄	89
Figure 35: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de l'ASAT un, quatre et cinq jours après administration du CCl ₄	90
Figure 36: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) un, quatre et cinq jours après administration du CCl ₄	91
Figure 37: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur le taux de malondialdéhyde un, quatre et cinq jours après administration du CCl ₄	92
Figure 38: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) un, quatre et cinq jours après administration du CCl ₄	93
Figure 39: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de la catalase (CAT) un, quatre et cinq jours après administration du CCl ₄	94
Figure 40: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur le taux de glutathion (GSH) un, quatre et cinq jours après administration du CCl ₄	95
Figure 41: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur le taux de malonedialdéhyde (MDA) un, quatre et cinq jours après administration du CCl ₄	96
Figure 42: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de l'ALAT un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol	97
Figure 43: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de l'ASAT un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol	98
Figure 44: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol	99

Figure 45: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur le taux de malondialdéhyde un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol	100
Figure 46: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) un, quatre et cinq jours après administration du CCl ₄	101
Figure 47: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur l'activité de la catalase (CAT) un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol	102
Figure 48: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur le taux de glutathion (GSH) un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol	103
Figure 49: Effets de l'extrait de <i>D. adscendens</i> sur le taux de malondialdéhyde un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol	104
Figure 50: Effets de l'administration de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au tétrachlorure de carbone (CCl ₄) au jour 5	106
Figure 51: Effets de l'administration de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au paracétamol au jour 5.	107
Figure 52: Intensités de la fluorescence cellulaire lors de l'étude de l'effet de l'administration de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au tétrachlorure de carbone (CCl ₄) au jour 4	108
Figure 53: Intensités de la fluorescence cellulaire lors de l'étude de l'effet de l'administration de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au tétrachlorure de carbone (CCl ₄) au jour 5	109
Figure 54: Intensités de la fluorescence cellulaire lors de l'étude en fonction du temps de l'effet de l'administration de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au tétrachlorure de carbone (CCl ₄).....	110
Figure 55: Intensités de la fluorescence cellulaire lors de l'étude de l'effet de l'administration de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au paracétamol au jour 4	112
Figure 56: Intensités de la fluorescence cellulaire lors de l'étude de l'effet de l'administration de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au paracétamol au jour 5	113
Figure 57: Intensités de la fluorescence cellulaire lors de l'étude en fonction du temps de l'effet de l'administration de l'extrait aqueux de <i>D. adscendens</i> sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au paracétamol.	114

RESUME

Desmodium adscendens (DA) est une plante herbacée trouvée en Afrique et en Amérique du Sud, et utilisée en médecine traditionnelle contre les maladies liées au foie. Le but de ce travail a été d'évaluer *in vitro* et/ou *in vivo* les propriétés anti-hépatotoxiques et anti-Virus de l'Hépatite C (VHC) de l'extrait aqueux de *D. adscendens* et son effet sur la différenciation des cellules souches en hépatocytes. S'agissant de l'activité anti-hépatotoxique des extraits, le modèle d'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) sur des hépatocytes de rats en culture primaire a été utilisé. Les tests de viabilité cellulaire au bromure de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), d'intégrité membranaire en mesurant l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT) libérée dans le milieu d'incubation et la teneur en malondialdéhyde (MDA) ont été réalisés. Les effets inhibiteurs sur le virus de l'hépatite C (VHC) ont été réalisés en utilisant des systèmes de réplicons subgénomiques de génotype 1b et des particules de VHC dérivées de cultures cellulaires (VHCcc). Les taux d'infection et de réplication ont été évalués en mesurant respectivement l'activité de la luciférase et l'immunofluorescence indirecte. L'effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux de *D. adscendens* chez des rats *Wistar albinos* vis-à-vis des hépatopathies induites par le CCl₄ ou le paracétamol et le suivi dans le temps de son impact sur l'expression des marqueurs de la différenciation des cellules souches en hépatocytes ont par la suite été réalisés. Concernant l'activité hépatoprotectrice, les tests d'intégrité membranaire via l'activité des transaminases (ALAT, ASAT), de la phosphatase alcaline (PAL) et la teneur en MDA, des tests du système antioxydant via des activités des enzymes antioxydants (CAT, SOD) et du glutathion réduit (GSH) ont été réalisés. Quant au suivi dans le temps de son impact sur le processus de production des hépatocytes, le facteur de transcription Sox-17 a été mis en évidence par un anticorps polyclonal de lapin dans une région interne de Sox-17 d'origine humaine et la révélation a été faite à la fluorescéine (FITC). Comme résultats, l'extrait aqueux de *D. adscendens* a démontré un effet cytoprotecteur en préservant les hépatocytes primaires chez les rats, des conséquences hépatotoxiques du CCl₄ principalement en inhibant les dommages oxydatifs, en augmentant le pourcentage de viabilité cellulaire, en réduisant la libération d'ALAT et en diminuant la formation de MDA. L'extrait aqueux de *D. adscendens* a inhibé significativement l'expression de l'ARN du VHC dans des réplicons subgénomiques 1b et ne présentait aucune cytotoxicité pour les cellules LucUbiNeo-ET, ce jusqu'à la concentration de 500 µg/mL. *D. adscendens* a modulé de manière significative les activités circulantes de CAT, GSH, ASAT, ALAT et PAL lors d'une atteinte aiguë par le CCl₄ ou le paracétamol, traduisant son potentiel anti-hépatotoxique et l'identifiant comme antioxydant ou piègeur de radicaux libres à travers d'une part l'augmentation de l'activité de la CAT et du taux de GSH ; et d'autre part la diminution des activités des transaminases et de la PAL et du taux de TBARS. L'extrait aqueux de *D. adscendens* augmente l'expression de la protéine Sox17 dans le foie des rats intoxiqués préalablement au CCl₄ ou au paracétamol, ce qui stipule que cet extrait stimulerait la maturation des cellules de l'endoderme définitif, principales cellules de la voie de différenciation des cellules souches en hépatocytes. L'extrait aqueux de *D. adscendens* a un potentiel hépatoprotecteur et hépatocurateur contre les dommages multiformes qui peuvent être induits par des toxiques (CCl₄), des médicaments (paracétamol) ou des virus (VHC). Ces résultats contribuent à la valorisation de *D. adscendens* comme potentiel source de métabolites secondaires pour le traitement de diverses formes d'hépatites.

Mots clés : *D. adscendens*, CCl₄, anti-hépatotoxique, Virus de l'hépatite C, Sox-17

ABSTRACT

Desmodium adscendens (DA) is an herbaceous plant found in Africa and South America, and is used in traditional medicine against liver diseases. The aim of this work was to evaluate in vitro and/or in vivo anti-hepatotoxic and anti-Hepatitis C Virus (HCV) properties of the aqueous extract of DA and its effect on the differentiation of stem cells into hepatocytes. For the anti-hepatotoxic activity of the extract, a model of hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rat hepatocytes in primary culture was used. Cell viability tests with 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) bromide, membrane integrity by measuring the activity of alanine aminotransferase released in the incubation medium and content of malondialdehyde (MDA) were carried out. Inhibitory effects on HCV were achieved using genotype 1b sub-genomic replicon systems and cell culture-derived HCV particles (HCVcc). Infection and replication rates were assessed by measuring luciferase activity and indirect immunofluorescence, respectively. Hepatoprotective effect of DA aqueous extract in albino Wistar rats with liver diseases induced by CCl₄ or paracetamol and the monitoring over time of its impact on the expression of markers of stem cells differentiation into hepatocytes were subsequently performed. Regarding hepatoprotective activity, membrane integrity tests via alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) activities and MDA level, antioxidant tests via activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD) and reduced glutathione level (GSH) were made. As for the monitoring over time of its impact on hepatocyte production process, the Sox-17 transcription factor was detected by a polyclonal rabbit antibody in an internal region of Sox-17 of human origin and the revelation being made to fluorescein (FITC). Results showed that, DA aqueous extract exhibited cytoprotective effect by protecting rat primary hepatocytes against CCl₄-induced hepatotoxicity mainly by inhibiting oxidative damage, increasing the percentage of cell viability, reducing the release of ALT and decreasing the formation of MDA. DA aqueous extract significantly inhibited expression of HCV RNA in sub-genomic 1b replicons and this extract did not induced cytotoxicity for LucUbiNeo-ET cells, up to a concentration of 500 µg / mL. DA significantly modulated the circulating activities of CAT, GSH, AST, ALT and PAL during acute CCl₄ or paracetamol damage, thus, reflecting its anti-hepatotoxic potential and identifying it as an antioxidant or scavenger of free radicals through the increase of CAT activity and GSH on one hand; and the decrease of transaminases and ALP activities and TBARS levels on the other hand. The aqueous extract of DA increased the expression of the Sox17 protein in the liver of rats exposed to CCl₄ or paracetamol, implying that this extract can stimulate the maturation of cells of the final endoderm (the major cells of the stem cell differentiation pathway into hepatocytes). The aqueous extract of DA has hepatoprotective and hepatocurative potential against the multifaceted damage that can be induced by toxins (CCl₄), drugs (paracetamol) or viruses (HCV). These results contribute to the promotion of DA as a potential source of secondary metabolites for the treatment of various forms of hepatitis.

Keywords: *D. adscendens*, CCl₄, anti-hepatotoxic, Hepatitis C, Sox-17

INTRODUCTION GENERALE

1. Introduction

Le foie est l'un des organes les plus importants de l'organisme et est principalement impliqué dans le métabolisme des agents endogènes et exogènes. Il joue un rôle important dans l'élimination et la détoxification des substances nocives pour le corps. Au cours de la détoxification des xénobiotiques, des espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont générés, et ces derniers déclenchent une série de réactions de peroxydations lipidiques dans les hépatocytes, et provoquent par la suite un stress oxydatif, la mort cellulaire et des maladies hépatiques, telles que le carcinome hépatocellulaire, l'hépatite virale et alcoolique et bien d'autres (**Kohen & Nyska, 2002; Vitaglione et al., 2004**). La maladie du foie est un problème de santé majeur dans le monde, avec une forte endémicité dans les pays en développement (**Adewusi & Afolayan, 2010**)

Les lésions hépatiques induites par les polluants environnementaux tels que les métaux lourds, les solvants industriels, les mycotoxines ; des produits chimiques, des médicaments tel le paracétamol, et des virus dont celui de l'hépatite C, constituent un problème toxicologique bien connu. La pathogenèse des dommages est multifactorielle, allant de l'inflammation et du stress oxydatif aux réactions immunologiques et apoptotiques (**Gao et al., 2012; Ivanov et al., 2013; el halawany et al., 2014**). Le tétrachlorure de carbone (CCl_4) et le paracétamol encore appelé N-acétyl-para-aminophénol (APAP) via leur biotransformation respective en radicaux libres [trichlorométhyl (CCl_3°) ou trichlorométhyl peroxy ($\text{CCl}_3\text{O}_2^\circ$)] et en métabolites réactifs (N-acétyl-para-benzo-quinone-imine), sont des puissants hépatotoxines ayant servi de composés modèles pour l'étude de l'hépatotoxicité et des mécanismes cellulaires à l'origine des dommages oxydatifs (**Basu, 2003; Jaeschke et al., 2002**). Ils ont également été utilisés pour évaluer le potentiel thérapeutique des médicaments et des antioxydants alimentaires (**Basu, 2003**). Les hépatocytes isolés en culture primaire permettent d'évaluer les effets par interactions directes des composés étudiés (**el halawany et al., 2014**).

Le taux de la population mondiale porteurs chroniques du virus de l'hépatite C est estimé à environ 3%, avec chaque année près de 4 millions de nouvelles infections déclarées. Depuis son identification en 1989, le virus de l'hépatite C (VHC) s'est singularisée comme devenu la principale cause du développement du cancer de foie, avec plus de 500 000 décès annuellement (**Averhoff et al., 2012; Choo et al., 1989**). Au Cameroun, la prévalence du VHC est estimé à un taux de 1,1% (**Galani et al., 2016**).

Bien qu'il y ait un grand progrès dans la compréhension de la pathologie moléculaire des lésions hépatiques, il existe encore peu de médicaments capables de stimuler la fonction hépatique, offrant une protection hépatique contre les dommages ou contribuant à la régénération des cellules hépatiques.

Dans la perspective de recherche de nouveaux agents antihépatotoxiques, la phytothérapie émerge comme une alternative et est devenue une solution d'importance locale, régionale et mondiale. C'est dans ce cadre que s'inscrit *Desmodium adscendens* (*Fabaceae*), plante herbacée trouvée en Afrique et en Amérique du Sud, et utilisée en médecine traditionnelle pour diverses indications, y compris la gestion de l'asthme et des maladies liées au foie (**Magielse et al., 2013a**). Plusieurs autres études ont été conduites sur cette plante. Dans la région de la forêt tropicale, les préparations de *D. adscendens* (DA) sont utilisées pour traiter les troubles du système digestif ou les douleurs abdominales et dorsales (**Sanz-Biset et al., 2009**). L'extrait hydroalcoolique de DA présente en outre une sécurité contre la lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire du foie humain (HepG2) et la protège d'une éventuelle lésion (**François et al., 2015**).

Il a été indiqué que les principaux métabolites secondaires de *D. adscendens* comprennent les flavonoïdes (rutine, vitexine et isovitexine), les saponines triterpéniques, les amines et les alcaloïdes (**Magielse et al., 2013b; Pothier et al., 2006a; Rastogi et al., 2011**). Les saponines se trouvent principalement dans les feuilles, les flavonoïdes - les fleurs et les alcaloïdes dans les feuilles et les tiges. La composition qualitative de *D. adscendens* dépend du lieu de sa culture (**N'gouemo et al., 1996a; Pothier et al., 2006b**).

On note par ailleurs que malgré ses utilisations multiples dans la médecine traditionnelle, aucun travail scientifique n'avait été mené jusqu'ici sur les propriétés de *D. adscendens* contre l'infection au virus de l'hépatite C, surtout dans un pays comme le Cameroun où la prévalence de cette infection reste importante (7,6%) chez les personnes âgées (**Galani et al., 2016**) et l'accessibilité à la thérapie moderne encore faible. Par ailleurs, les travaux conduits sur les effets de certains composés isolés de *D. adscendens* sur la fonction hépatique lors d'une intoxication ont montré son caractère hépatoprotecteur (**Magielse et al., 2013b**). Il est connu que le remplacement des hépatocytes détruits lors des intoxications peut se faire par régénération, mais l'on ignore par quel mécanisme ce processus se déroule. Aussi, la présente étude vise à apporter une contribution significative sur ces questionnements de preuve scientifique de l'effet de *D. adscendens* dans l'hépatopathie liée au virus de l'hépatite C et du mécanisme de remplacement des cellules hépatiques détruites.

2. Hypothèse de Recherche

Les effets hépatoprotecteurs de *Desmodium adscendens* s'exercent à travers l'inhibition des mécanismes de générations d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) et du cycle infectieux du VHC d'une part et le repeuplement cellulaire par différenciation des cellules souches en hépatocytes d'autre part.

3. Objectifs

3.1. Objectif général

L'objectif général du présent travail a visé à évaluer *in vitro* et/ou *in vivo* les propriétés anti-hépatotoxiques et antivirales de l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* sur le VHC et son effet sur la différenciation des cellules souches en hépatocytes.

3.2. Objectifs Spécifiques

Plus spécifiquement, il s'agissait pour l'extrait aqueux de *D. adscendens* :

- d'évaluer *in vitro* son effet sur les lésions aiguës induites par le CCl₄ sur des hépatocytes de rats fraîchement isolés ;
- de déterminer *in vitro* son effet sur des réplicons subgénomiques de génotype 1b du VHC et sur le cycle infectieux du VHC;
- d'étudier son impact sur l'expression des marqueurs de la différenciation et de la maturation hépatocytaire chez les rats intoxiqués au paracétamol et au CCl₄.

**CHAPITRE I : REVUE DE LA
LITTERATURE**

1.1. Généralités sur le foie

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps après la peau. Il est considéré, du fait de son rôle majeur dans l'homéostasie tissulaire, comme un des organes les plus complexes de l'organisme. Le foie et la vésicule biliaire assurent un certain nombre de fonctions essentielles de l'organisme parmi lesquelles la fonction de désintoxication (**Marieb, 1999**). Du fait de l'importance de cet organe, les maladies qui l'affectent sont préoccupantes.

1.1.1. Anatomie et histologie du foie

1.1.1.1. Anatomie et vascularisation du foie

Le foie est situé dans l'abdomen. Sa forme générale est triangulaire ; sa face supérieure, convexe, suit les contours du diaphragme ; sa face inférieure est parcourue par trois sillons, l'un d'eux est le hile du foie, où convergent les organes qui arrivent au foie ou en partent. Le foie est formé de deux lobes principaux (Figure 1A), le droit et le gauche, séparés par un ligament rond et falciforme, et de deux petits lobes, le lobe caudé ou lobe de Spiegel situé à la face postérieure et le lobe carré situé à la face inférieure (**Marieb, 1999**).

Le foie est très richement vascularisé, ce qui lui confère une couleur rouge foncé ; pas moins d'un litre et demi de sang traverse cet organe chaque minute. L'apport sanguin au foie est double : d'une part, la veine porte apporte au foie le sang de la rate et du tube digestif (plus de 75% du débit sanguin total) ; d'autre part, l'artère hépatique, apporte au foie du sang artériel oxygéné (25% restant). Aux côtés de ces deux vaisseaux circule le canal hépatique, qui draine hors du foie la bile sécrétée par ce dernier.

Du point de vue microscopique, le foie est constitué d'une myriade d'unités fonctionnelles individuelles appelées lobules (**Marieb, 1999**). (Figure 1B).

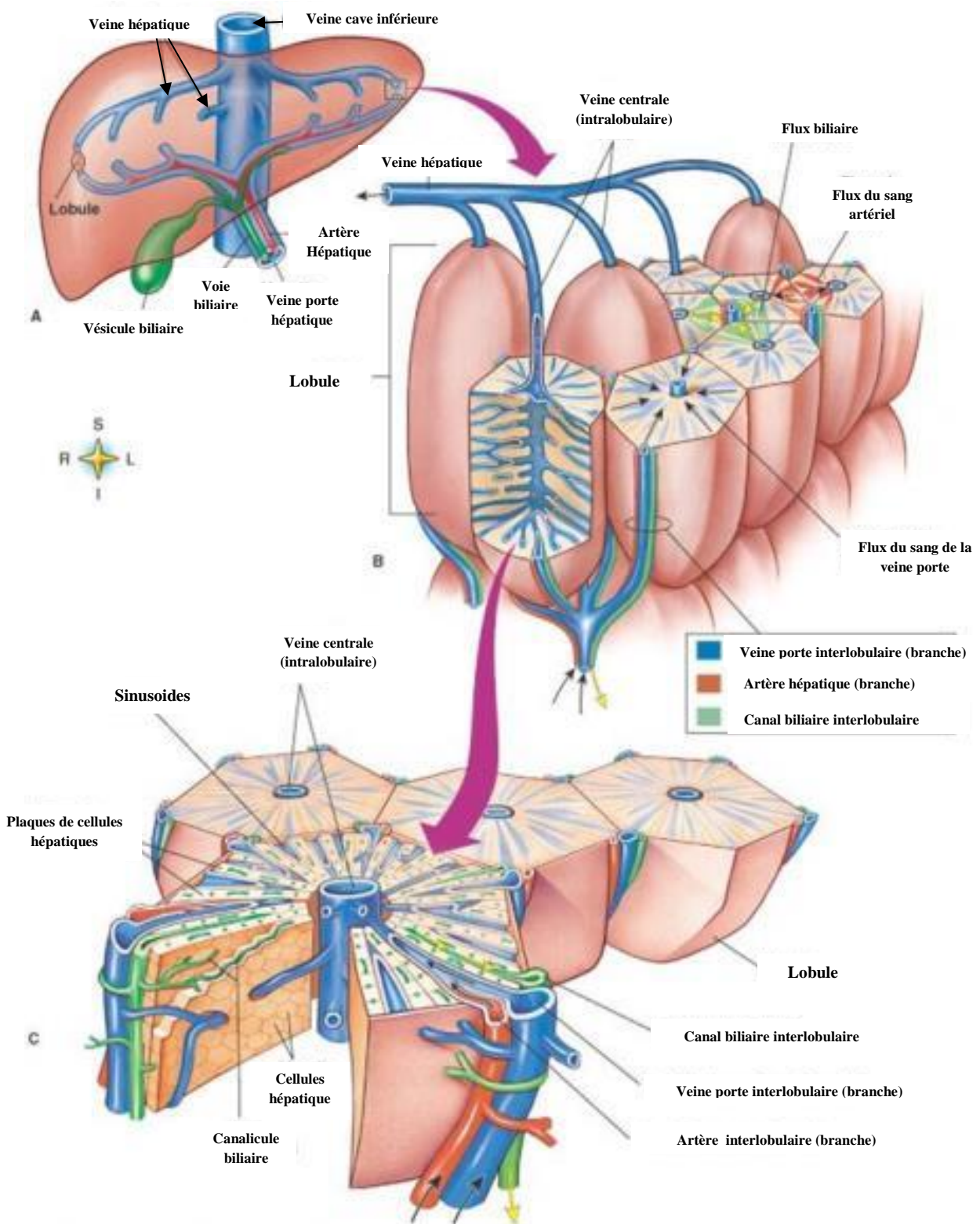


Figure 1: Représentation schématique du foie et du lobule hépatique (Marieb, 1999)

A: Foie; B: Lobule hépatique; C: Ultrastructure du lobule hépatique.

1.1.1.2. Histologie du foie

Le foie est formé de deux catégories principales de cellules : les hépatocytes ou cellules parenchymateuses et les cellules de la paroi des capillaires sinusoides ou cellules non parenchymateuses, elles même comprenant 5 types cellulaires. Les différentes cellules du foie interagissent entre elles pour un fonctionnement optimal du foie (Figure 2).

1.1.1.2.1. Les hépatocytes ou cellules parenchymateuses

Les hépatocytes constituent la plus grande partie du foie et occupent environ 70% du volume du foie (**Guillouzo, 1988**). Ce sont de volumineuses cellules polyédriques dont la taille (20 à 30µm) varie en fonction de l'activité métabolique. Les hépatocytes possèdent un grand noyau (8 à 10 µm) entouré d'un cytoplasme riche en organites cellulaires, témoignant de leurs multiples fonctions. Parmi les organites cellulaires, on distingue :

- Les mitochondries qui participent à la phosphorylation oxydative et à l'oxydation des acides gras. La forme et le nombre des mitochondries varient en fonction de l'activité de l'hépatocyte et de sa localisation dans la cellule (**Guillouzo, 1988**) ;

- Le réticulum endoplasmique (RE) : Il occupe 20% du volume hépatocytaire. On distingue :

- o le réticulum endoplasmique granuleux (REG) ou qui joue un rôle important dans la synthèse des protéines plasmiques fabriquées par le foie, notamment l'albumine, la fibrinogène et d'autres protéines de l'inflammation et de la coagulation (**Amar-Costesec, 1989**) ;

- o le réticulum endoplasmique lisse (REL) ou microsomes. Il contient les enzymes d'hydroxylation et de conjugaison qui jouent un rôle important dans le métabolisme de la bilirubine. Il intervient dans l'estérification des acides gras, la glycogénolyse, la synthèse du cholestérol et des acides biliaires. Il est le siège principal du système microsomal oxydatif qui intervient dans le métabolisme des lipides, des xénobiotiques et des stéroïdes (**Amar-Costesec, 1989**) ;

- L'appareil de golgi : il représente le système vésiculaire à travers lequel transitent les protéines fabriquées par le REG et secrétées dans le plasma ;

- Les lysosomes : ils ont une activité phosphatasique acide et catabolisent les corps étrangers, les organites vieilliss et ils participent au stockage du fer ;

- Les ribosomes libres : ils jouent un rôle important dans la synthèse des hépatocytes eux-mêmes ;

- Les grains de glycogène : ils jouent un rôle de stockage ;
- Les péroxysomes : Leurs fonctions ne sont pas clairement élucidées. Toutefois, on pense qu'ils interviendraient dans le devenir du peroxyde d'hydrogène, le métabolisme des purines, des lipides, des alcools et de la gluconéogenèse. Ils sont spécialisés dans la β -oxydation des acides gras à longue chaîne (**Amar-Costesec, 1989**).

1.1.1.2.2. Les cellules non parenchymateuses

1.1.1.2.2.1. Les cellules endothéliales de la sinusoïde

Elles représentent 3% de la masse du parenchyme. Elles diffèrent de celles des autres endothéliums vasculaires de l'organisme en ce qu'elles n'ont pas de membrane basale et sont fenêtrées, assurant aux hépatocytes un accès facile aux nutriments et aux macromolécules du plasma. Les cellules endothéliales interviennent aussi dans l'endocytose de molécules (phagocytose) et de particules (pinocytose) (**Amar-Costesec, 1989**) et dans le métabolisme des lipoprotéines. Les cellules endothéliales contribuent au transport, la coagulation, la fibrinolyse, l'inflammation, la réponse immune, la régulation de la pression sanguine, l'angiogénèse, le métabolisme des lipides.

1.1.1.2.2.2. Les cellules de Kupffer

Elles représentent 2% de la masse du parenchyme. Elles sont fusiformes et elles sont des macrophages (**Amar-Costesec, 1989**) (**Smedsrod et al., 1994**). Parmi leurs principales fonctions se trouvent la phagocytose de particules étrangères, l'élimination d'endotoxines et d'autres substances nocives. Elles secrètent, après activation, différents produits comme des protéases et des cytokines qui auront une influence sur les cellules parenchymateuses et sinusoidales. Elles participent à la modulation de la réponse immunitaire par la libération de médiateurs et d'agents cytotoxiques.

1.1.1.2.2.3. Les cellules périsinusoïdales ou cellules étoilées (cellules de Ito)

Elles représentent environ 1,5% de la masse du parenchyme. Elles ont trois fonctions principales à savoir un rôle de soutien car formeraient l'armature du sinusoides, un rôle de stockage des graisses (**Blaner et al., 2009**) et de la vitamine A et enfin un rôle dans la synthèse du collagène.

1.1.1.2.2.4. Les cellules à granulation ou « *pit cells* »

Ce sont des lymphocytes résidents possédant des activités antitumorales de type *natural killer* (Peng et al., 2016). Ils sont visibles dans la lumière capillaire mais peuvent avoir des prolongements pénétrant la barrière endothéliale.

1.1.1.2.2.5. Les cellules épithéliales : les cholangiocytes

Ce sont des cellules épithéliales qui tapissent les canaux biliaires extra- et intrahépatiques ainsi que la vésicule biliaire. Les cholangiocytes représentent 3 à 5% de la masse hépatique. Par l'expression de diverses protéines (transporteurs, canaux ioniques ou échangeurs), ils contrôlent notamment la composition, le pH ainsi que le transport de la bile à l'extérieur du foie. Contrairement à d'autres cellules épithéliales, les cholangiocytes sont morphologiquement et fonctionnellement hétérogènes. On distingue les petits cholangiocytes aux capacités prolifératives et les grands impliqués dans la sécrétion de la bile (Marzoni et al., 2002)

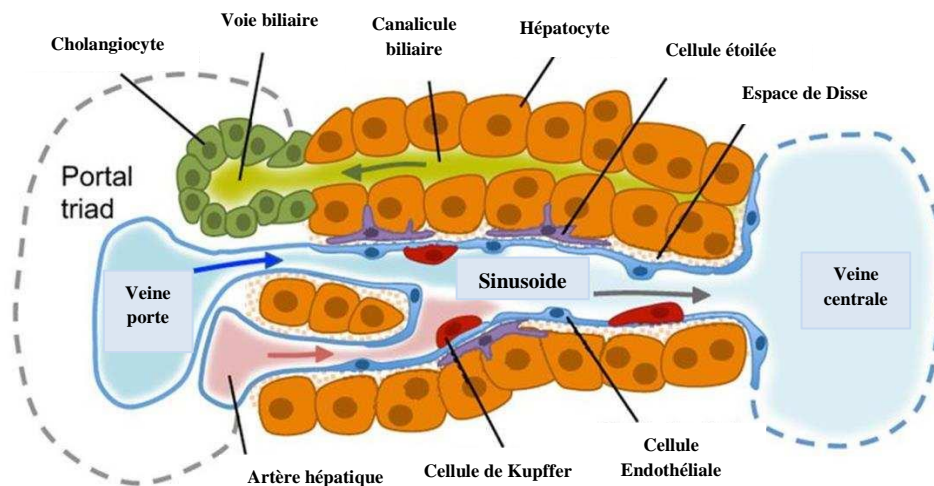


Figure 2: Les différentes populations cellulaires hépatiques (Gordillo, 2015)

1.1.2. Les fonctions du foie

Le foie est l'organe principal de métabolisme et d'excrétion. Diverses fonctions lui sont ainsi dévolues, notamment :

- la biosynthèse, le stockage et la sécrétion des glucides, lipides, vitamines et oligo-éléments ;
- la biosynthèse des protéines plasmatiques ;
- la captation, la dégradation et la détoxification des hormones et xénobiotiques ;
- la synthèse et l'excrétion de la bile ;
- la défense anti-tumorale et antivirale

1.2. Développement du foie

1.2.1. Développement embryonnaire du foie

Au total trois feuilletts embryonnaires sont issus de la gastrulation à savoir l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. De ces trois feuilletts, le foie dérive majoritairement de l'endoderme à l'origine de toutes les cellules épithéliales des systèmes respiratoire et digestif donc des hépatocytes et des cholangiocytes. Il est aussi à l'origine des cellules souches. Les autres types cellulaires (cellules endothéliales, de Küppfer et de Ito) dérivent du mésoderme par l'intermédiaire du septum transverse (Figures 3 et 4).

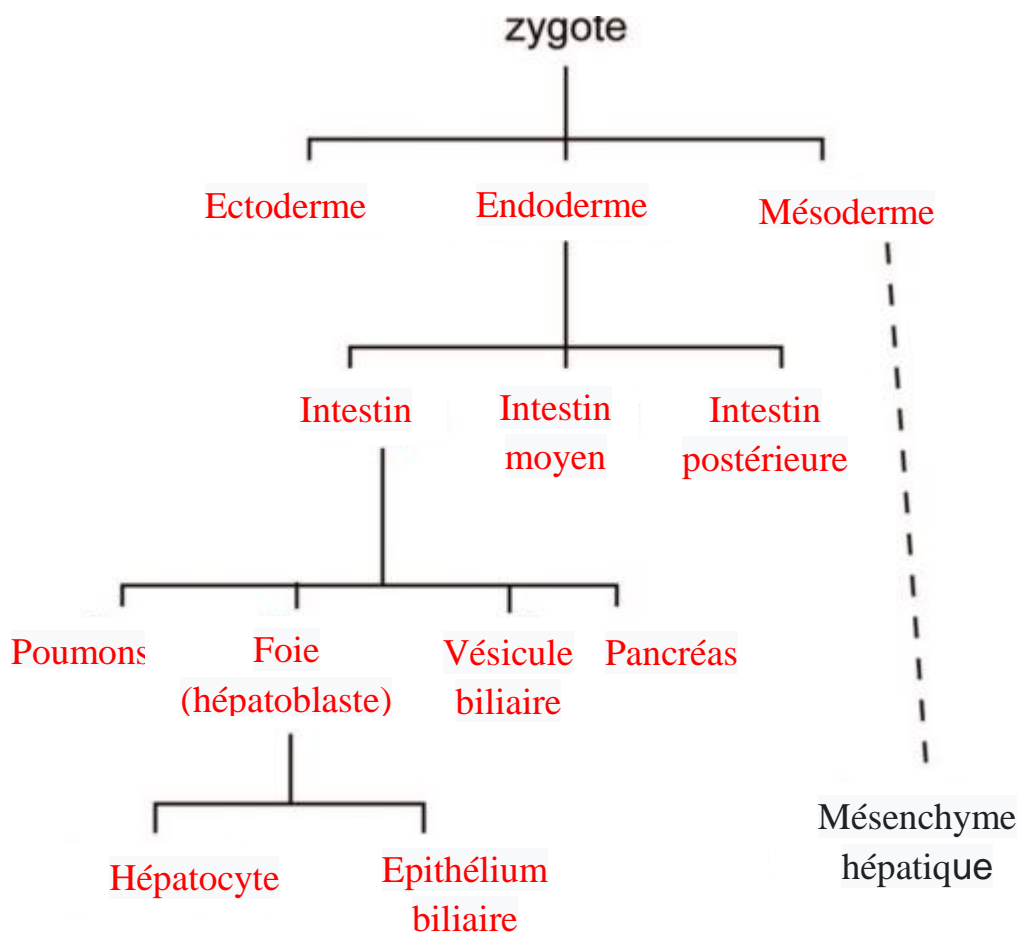


Figure 3: La lignée de cellules hépatiques (Zorn, 2008a)

La lignée cellulaire évoluée au cours du développement hépatique (rouge) de l'endoderme non engagé aux hépatocytes adultes fonctionnels et biliaires épithélium.

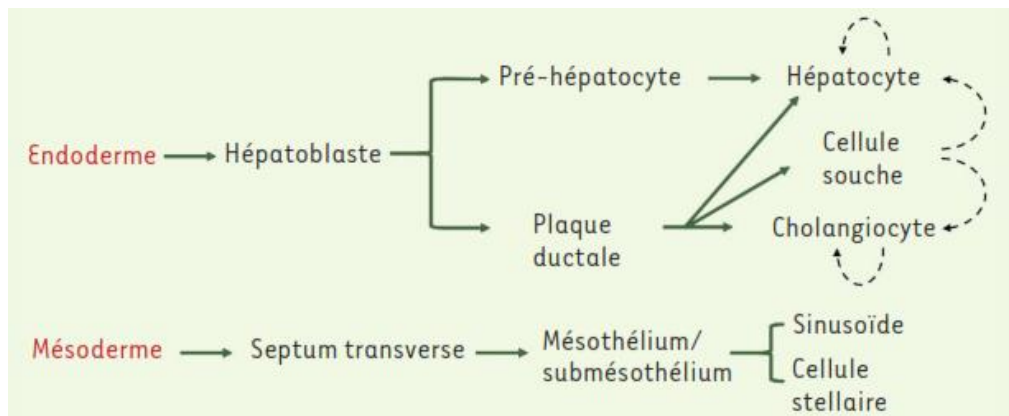


Figure 4: Développement des lignages hépatiques (Zorn, 2008a).

Le développement du foie est un processus par étapes qui comprend des événements biologiques distincts.

Le foie se développe à partir de l'endoderme sous l'influence de signaux provenant des tissus voisins (Lemaigre, 2009; Si-Tayeb et al., 2010a). La couche germinale de l'endoderme est établie pendant la gastrulation et forme un tube intestinal primitif qui est subdivisé en régions de l'intestin antérieur, de l'intestin moyen et de l'intestin postérieur. Ce développement du foie se caractérise à ces stades par la formation d'un bourgeon cellulaire constitué d'une population en apparence homogène de cellules progénitrices hépatiques précoces, également appelées hépatoblastes. Ces dernières expriment l'albumine et l'alpha-fétoprotéine (AFP) et ont le potentiel de se différencier en cellules épithéliales des hépatocytes et des voies biliaires (cholangiocytes) (Banales et al., 2019). Par ailleurs, il est à noter que l'un des membres du groupe à haute mobilité lié à Sry (Sry-HMG) appelé Sox 17, est un des facteurs de transcription qui est nécessaire pour la formation endodermique et le développement du foie chez plusieurs espèces (Ayatollah et al., 2012). L'expression du gène Sox17 est requise pour la formation d'un endoderme définitif qui donne naissance à divers tissus, dont le foie (Ayatollah et al., 2012). Les cellules progénitrices prolifèrent tout au long du développement foetal et atteignent une maturation fonctionnelle à différents stades en se différenciant en hépatocytes ou en cholangiocytes.

En cas d'atteinte du foie, les hépatocytes et cholangiocytes se régénèrent par prolifération ou par différenciation à partir des cellules souches.

1.2.2. Différenciation des hépatocytes et des cellules épithéliales biliaires

Les hépatocytes et les cellules des voies biliaires proviennent d'un précurseur commun, l'hépatoblaste (Germain et al., 1988a). Au départ de cette différenciation, les hépatoblastes expriment des gènes associés à la fois aux hépatocytes adultes (facteur nucléaire

alpha 4 des hépatocytes-Hnf4 α , albumine) et aux cellules épithéliales biliaires (cytokératine-19), ainsi qu'aux gènes du foie fœtal tels que l' α -foetoprotéine (Afp). Les hépatoblastes en contact avec la veine porte forment une monocouche, puis une double couche, de précurseurs biliaires cuboïdes qui augmentent l'expression de la cytokératine-19 (CK-19) et régulent à la baisse les gènes hépatiques. Les hépatoblastes du parenchyme hépatique qui ne sont pas en contact avec les veines portes se différencient progressivement en hépatocytes matures qui acquièrent leur morphologie épithéliale caractéristique disposée en accords hépatiques avec des canalicules biliaires sur les surfaces apicales.

1.2.2.1. Différenciation hépatocytaire

Au milieu de la gestation, les cellules hématopoïétiques du foie sécrètent la cytokine Oncostatin M (OSM), qui en combinaison avec les hormones glucocorticoïdes, facteur de croissance hépatocytaire (HGF) et le gène wingless (Wnt) favorise la différenciation des hépatocytes (**Kamiya et al., 2001; Matsui et al., 2002; Suzuki et al., 2003; Tan et al., 2008**). Certaines preuves suggèrent que l'activité du HGF et de l'OSM est équilibrée par le TNF α , qui inhibe la maturation et maintient la capacité de prolifération des hépatocytes fœtaux, permettant au foie de croître à la taille appropriée avant de se différencier (**Akihida Kamiya et Gonzalez, 2004**).

Ces facteurs sécrétés agissent en partie en régulant un certain nombre de facteurs de transcription enrichis du foie, y compris, entre autres, les récepteurs des hormones nucléaires et le HNF4 α (Figure 5), qui fonctionnent dans un réseau inter-régulateur complexe pour contrôler l'expression des gènes des hépatocytes (**Cheng et al., 2006; Odom et al., 2004**). HNF4 α est d'abord exprimé dans les hépatoblastes et les hépatocytes fœtaux Hnf4 α - / - ne parviennent pas à exprimer de nombreuses enzymes hépatiques matures et manquent de morphologie hépatocytaire normale (**Asumda et al., 2018; Hou et al., 2018; Mathapati et al., 2016**).

1.2.2.2. Différenciation des cellules épithéliales biliaires (CEB)

Parallèlement à la différenciation hépatocytaire, certains hépatoblastes vont se différencier en cellules biliaires, les cholangiocytes.

Des signaux candidats du mésenchyme périportal favorisent le développement des cellules épithéliales biliaires (CEB) (Figure 5). En effet, un gradient de signalisation TGF β émanant de la région porte favorise la différenciation biliaire dans les hépatoblastes adjacents (**Weinstein et al., 2001; Clotman & Lemaigre, 2006**). La signalisation Wnt / β -caténine

favorise également le développement de la CEB (Cotoi et al., 2012; Chan & Werb, 2015), et peut agir en partie en stimulant l'expression de EGF, qui avec le HGF peut induire la formation de structures biliaires dans les hépatocytes en culture (Wu et al., 2017; Vallée 2018; Huang et al., 2019). Par ailleurs, l'activation de Notch-2 dans l'hépatoblaste adjacent est nécessaire pour maintenir (mais pas initier) la différenciation CEB et pour une morphogénèse appropriée des voies biliaires (Yu et al., 2015; Zou et al., 2016; Rallis et al., 2019).

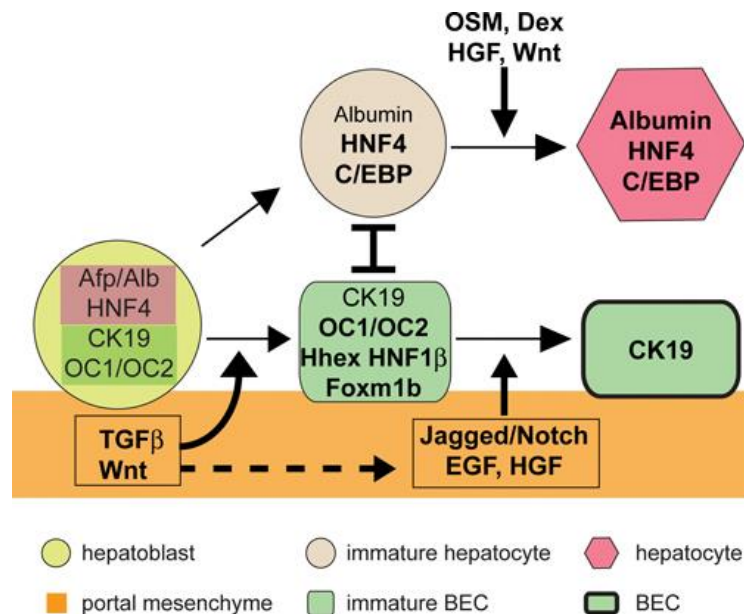


Figure 5: Hépatocytes et ségrégation de la lignée de l'épithélium biliaire (Zorn, 2008a)

Le schéma illustre un modèle de différenciation des hépatoblastes en hépatocytes ou cellules épithéliales biliaires (CEB). Les hépatoblastes bi-potentiels expriment les gènes du foie fœtal (Afp) ainsi que les marqueurs des hépatocytes (albumine) et des BEC (CK19). Les preuves suggèrent que les signaux (éventuellement TGFβ et Wnts) du mésenchyme périportal améliorent l'expression des facteurs de transcription favorisant la CEB (OC1, OC2, HNF1β) dans les hépatoblastes adjacents, tandis qu'en même temps, ces signaux répriment l'expression des facteurs de transcription hépatogènes (HNF4 et C / EBP). En revanche, les hépatoblastes du parenchyme (qui ne subissent pas les signaux du mésenchyme périportal) régulent à la hausse l'expression des facteurs hépatogènes. On pense que l'antagonisme mutuel entre les deux groupes de facteurs de transcription renforce cette ségrégation de la lignée. La signalisation continue (Notch, EGF et HGF) du mésenchyme périportal est essentielle pour le remodelage de la plaque canalaire, tandis que d'autres facteurs (OSM, Dex, HGF et Wnt) favorisent la maturation des hépatocyte

1.3. Cellules souches

Les cellules souches sont des types cellulaires qui assurent le renouvellement physiologique des cellules et qui participent à la régénération tissulaire après une agression. Elles ont pour fonction essentielle de permettre, à l'état normal, le renouvellement physiologique des cellules différenciées d'un tissu parvenues au terme de leur durée de vie normale (Loeffler & Roeder, 2002; Shah & Allegrucci, 2013). Elles permettent également, après une agression, la régénération et le repeuplement du tissu lésé.

La plupart des tissus de l'organisme étant constitués par la coexistence de plusieurs lignées cellulaires, les cellules souches doivent être capables de donner naissance aux progéniteurs de ces différentes lignées, ces progéniteurs se différenciant ensuite progressivement en cellules matures, le plus souvent en plusieurs étapes successives.

Plusieurs propriétés caractérisent les cellules souches. En effet, elles doivent avoir en plus de l'aptitude à l'autorenouveaulement, elles doivent avoir la capacité de différenciation, d'existence sous forme quiescente, de se diviser de façon asymétrique pour donner les cellules filles dont l'une restant au stade cellule souche et l'autre se différenciant. On distingue :

- Les cellules souches multipotentes qui peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules matures ;
- Les cellules souches pluripotentes qui peuvent donner naissance à tous les types de cellules tissulaires adultes et de tissus extra-embryonnaires: les cellules qui soutiennent le développement embryonnaire ;
- Les cellules souches totipotentes qui peuvent donner naissance à un nouveau type cellulaire bénéficiant d'un soutien maternel approprié ;
- Les cellules souches Unipotentes qui ne peuvent former qu'une seule sorte de cellules différenciée.

1.3.1. Cellules souches embryonnaires du foie

Le foie adulte est un organe complexe qui contient deux populations principales de cellules épithéliales, les hépatocytes et les cellules biliaires intrahépatiques, associées à de nombreuses populations de cellules mésenchymateuses (fibroblastes, cellules endothéliales, ...), dont certaines sont hautement spécialisées.

C'est au cours de la vie embryonnaire que se différencient les diverses populations de cellules présentes dans le foie adulte.

Le processus de différenciation le mieux étudié est celui des deux lignées de cellules épithéliales présentes dans le foie adulte : les hépatocytes et les cellules biliaires.

1.3.2. Régénération et cellules souches hépatiques adultes

Dans un organisme adulte, on oppose habituellement les tissus à renouvellement permanent, comme le tissu hématopoïétique, la peau, la muqueuse digestive ou la muqueuse urothéliale, tous pourvus d'un compartiment de cellules souches, et les tissus statiques, comme le muscle, incapables de se renouveler et dépourvus de cellules souches. Et c'est dans ce contexte, que le foie occupe une position particulière.

Le foie adulte a une capacité de régénération remarquable et peut repousser complètement lorsque jusqu'à 70% de sa masse est éliminée. Le foie se régénère principalement par la prolifération d'hépatocytes matures (**Pu et al., 2016; Ibis et al., 2017; Oh et al., 2018**) . En effet, les hépatocytes ont une durée de vie longue, estimée à 200 jours chez le rat et à 400 jours chez l'homme. Ces hépatocytes, contrairement à la plupart des autres cellules épithéliales différenciées, conservent leurs capacités de division cellulaire et sont capables de se multiplier, sans perdre leur différenciation, en réponse à des facteurs de croissance. Leur taux de renouvellement est extrêmement faible. Ainsi, à l'état normal, dans le foie humain, le pourcentage d'hépatocytes en cycle cellulaire à un instant donné serait de l'ordre de 4 pour 1 000.

Cependant, le foie adulte contient également des cellules progénitrices hépatiques qui sont activées lorsque la prolifération des hépatocytes est inhibée, comme dans la cirrhose sévère (**Kordes et al., 2014; Shang et al., 2016**). Les progéniteurs hépatiques semblent résider dans les petits canaux biliaires terminaux et lorsqu'ils sont activés, ils prolifèrent et donnent naissance à une population cellulaire appelée «cellules ovales», qui peut se différencier à la fois en hépatocytes et en cellules biliaires (**Zhang et al., 2013; Gissen & Arias, 2015**). Le fait que les cellules ovales soient bipotentielles suggère qu'elles proviennent d'hépatoblastes fœtaux qui restent indifférenciés dans une niche de cellules souches à l'intérieur des canaux. Un certain nombre des voies de développement qui régulent l'hépatogenèse dans l'embryon, comme HGF, FGF, OSM, TNF α et Wnt semblent contrôler l'activation des cellules ovales ainsi que la prolifération des hépatocytes pendant la régénération (**Chen et al., 2018; Gudjonsson et al., 2010**).

1.3.3. Fabrication du foie à partir de cellules souches embryonnaires (CSE)

Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont capables d'un auto-renouvellement illimité et peuvent se différencier en n'importe quel type de cellule chez l'adulte. Une avancée considérable a été faite dans le processus de la récapitulation des voies contrôlant le développement hépatique normal dans les CSE.

Les CSE traitées à l'activine expriment les gènes du mésendoderme d'une manière temporelle presque identique à la gastrulation des mammifères. Après quelques jours, la plupart des cellules expriment des gènes endodermiques définitifs (Sox17 et Foxa2) (Figure 6), tandis que le mésoderme, la pluripotence (par exemple Oct4) et les gènes endodermiques embryonnaires supplémentaires sont régulés à la baisse (**Schroeder et al., 2012; Wang et al., 2018; Brokhman et al., 2019**).

Une compréhension détaillée des gènes spécifiques au stade exprimés au cours du développement normal du foie permet de suivre les progrès de la différenciation hépatique *in vitro*.

En utilisant ces protocoles de développement sur des CSE de souris et humaines, on réussit à générer des cultures où jusqu'à 70% des cellules présentent un phénotype semblable à un hépatocyte. Ces cellules présentent de nombreuses caractéristiques des hépatocytes, telles que l'expression des enzymes hépatiques, la morphologie des hépatocytes, le stockage du glycogène, l'absorption et le métabolisme des médicaments et la sécrétion d'albumine.

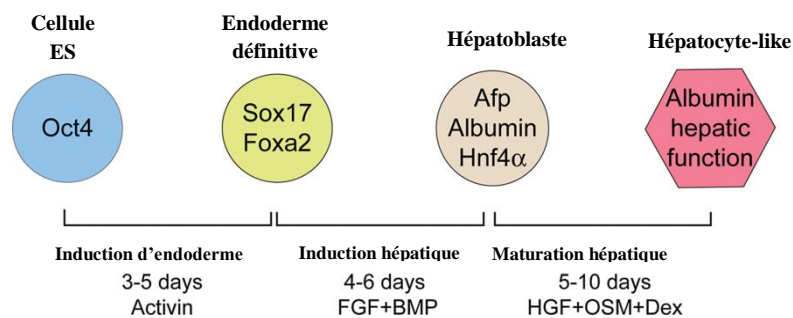


Figure 6: Différenciation hépatique *in vitro* à partir des cellules souches embryonnaires (Zorn, 2008b)

*Le diagramme illustre un protocole généralisé résumé des travaux de plusieurs laboratoires qui ont appliqué des paradigmes de développement aux cellules ES de souris et humaines pour diriger la différenciation des cellules de type hépatique *in vitro*. Les facteurs ajoutés aux cultures, les durées d'exposition et l'étape de développement que ces traitements sont censés imiter sont indiqués. Les types de cellules et les gènes marqueurs spécifiques de lignée clés exprimés dans ces cellules sont indiqués.*

1.4. Anomalies fonctionnelles et maladies du foie

1.4.1. Les anomalies fonctionnelles du foie

Ces anomalies peuvent être regroupées en quatre syndromes : le syndrome de cholestase, le syndrome de cytolyse, le syndrome d'insuffisance hépatocellulaire et le syndrome inflammatoire.

1.4.1.1. Le syndrome de cholestase

La cholestase est un flux biliaire réduit dans les voies biliaires. La cause de la cholestase peut être à l'intérieur (intra-hépatique) ou à l'extérieur du foie dans le canal cholédoque (extra-hépatique) (Ananth, 2018; Squires & McKiernan, 2018)

En raison de la grande capacité de réserve du système hépatobiliaire, les signes cliniques de cholestase (par exemple, l'ictère) ne se développent que lorsque le foie entier est affecté de manière diffuse (Rothuizen, 2009).

Biochimiquement, la cholestase entraîne une concentration accrue de tous les constituants biliaires, tels que le cholestérol, les acides biliaires et la bilirubine, ainsi que des enzymes qui sont très actives dans les cellules épithéliales biliaires ou la partie biliaire spécialisée de la membrane des hépatocytes : il n'est pas possible de différencier entre la cholestase extra et intrahépatique avec la biochimie (**Rothuizen, 2009**).

1.4.1.2. Les lésions hépatocytaires

Le syndrome de cytolyse est l'ensemble des signes liés à une lésion, voire une nécrose hépatocytaires (**Bedossa, 2017; Trout et al., 2018**). La lyse cellulaire hépatique est précédée de lésions biochimiques qui entraînent précocement une libération dans le sang de substances normalement stockées dans le cytoplasme (enzymes cellulaires, fer, vit B12) dont l'apparition ou l'augmentation dans le sang permettent de définir le syndrome de cytolyse hépatique. Les causes peuvent être traumatiques, alcoolique, virale, toxique ou immunologique. La cytolyse se caractérise par :

- Une élévation dans le sérum, d'enzymes normalement contenues dans la cellule hépatique, notamment les transaminases (ALAT, ASAT), la lactate déshydrogénase (LDH), la gamma glutamyltranspeptidase, l'ornithine-carbamyl-transférase (**Gissen & Arias, 2015**).

1.4.1.3. Le syndrome hépatoprive ou syndrome d'insuffisance hépatocellulaire

L'insuffisance hépatocellulaire (IHC) est l'ensemble des manifestations en rapport avec une diminution ou un arrêt des fonctions des hépatocytes (**Grippon et al., 1988**). C'est la conséquence des lésions de la machinerie de synthèse de l'hépatocyte dues aux hépatites aiguës (virales, médicamenteuses ou toxiques), des hépatites chroniques actives, de l'hépatite alcoolique et des cirrhoses (**EASL et al., 2017**).

1.4.1.4. Le syndrome inflammatoire

Il s'agit de l'expression biologique de la réaction inflammatoire, processus non spécifique de défense de l'organisme contre les agressions diverses (infections, traumatismes, nécroses tissulaires, vascularites, processus tumoraux ...).

1.4.2. Les maladies du foie

Elles sont désignées par le terme général d'hépatites. Les hépatites sont des inflammations du foie dont les causes peuvent être multiples. Suivant leur étiologie, on peut distinguer les hépatites virales, médicamenteuses et toxiques.

1.4.2.1. Les hépatites virales

1.4.2.1.1. Généralités sur les hépatites virales

Elles sont dues à l'infection des virus. Il existe au moins cinq types d'hépatites virales, liées chacune à un virus différent. On peut citer :

- L'hépatite A, due au virus de type A, transmise par les selles, la consommation d'eau ou d'aliments souillés.
- L'hépatite B, due au virus de type B, transmise par contact avec le sang ou d'autres liquides organiques d'une personne infectée.
- L'hépatite C, due au virus de type C, autrefois appelé virus non-A non-B, transmise par contact direct avec le sang d'un sujet infecté.
- L'hépatite D, due au virus de type D. Cette forme est rare et atteint le plus souvent des personnes qui ont fait usage de drogues intraveineuses et sont parallèlement porteuses du virus de l'hépatite B.
- L'hépatite E, due au virus de type E, est transmise et évolue généralement comme l'hépatite A.
- L'hépatite G dont le virus a été identifiée très récemment. Ce virus ainsi que l'hépatite qu'il occasionne reste très mal connu.

Alors que les hépatites A et E sont uniquement des hépatites aiguës, les hépatites B, C, D et E quant à elles sont aiguës ou chroniques.

1.4.2.1.2. Cas spécifique du Virus de l'hépatite virale C (HVC)

1.4.2.1.2.1. Généralités sur le VHC

Le virus de l'hépatite C (VHC) appartient à la famille des *Flaviviridae* et a été découvert en 1989. Il s'agit d'un virus enveloppé à ARN qui sur le plan structural est de petite taille (50 à 60 nm de diamètre) et composé de l'extérieur vers l'intérieur (figure 7) :

- d'une enveloppe lipidique constituée d'apolipoprotéines et des glycoprotéines E1 et E2 transmembranaires;
- de la capsidie icosaédrique formée par la polymérisation de la protéine C ou core; et
- du génome à ARN monocaténaire positif (**Adams et al., 2017**).

Il possède une variété génomique importante. En effet, il existe six génotypes principaux et de nombreux sous-types qui n'influent pas dans l'évolution de la maladie mais jouent notamment sur la réponse au traitement.

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'infection par le VHC touche environ 170 millions d'individus qui sont des porteurs chroniques, représentant environ 3% de la population mondiale. Au départ, l'infection est asymptomatique mais les infections chroniques finissent par provoquer des fibroses et des cirrhoses pouvant déboucher sur des carcinomes hépatocellulaires chez les patients (Shepard et al., 2005). Chaque année, 3 à 4 millions de personnes sont nouvellement infectées. et plus de 500 000 décès suite à des pathologies liées au VHC sont enregistrés (OMS hépatite, 2020).

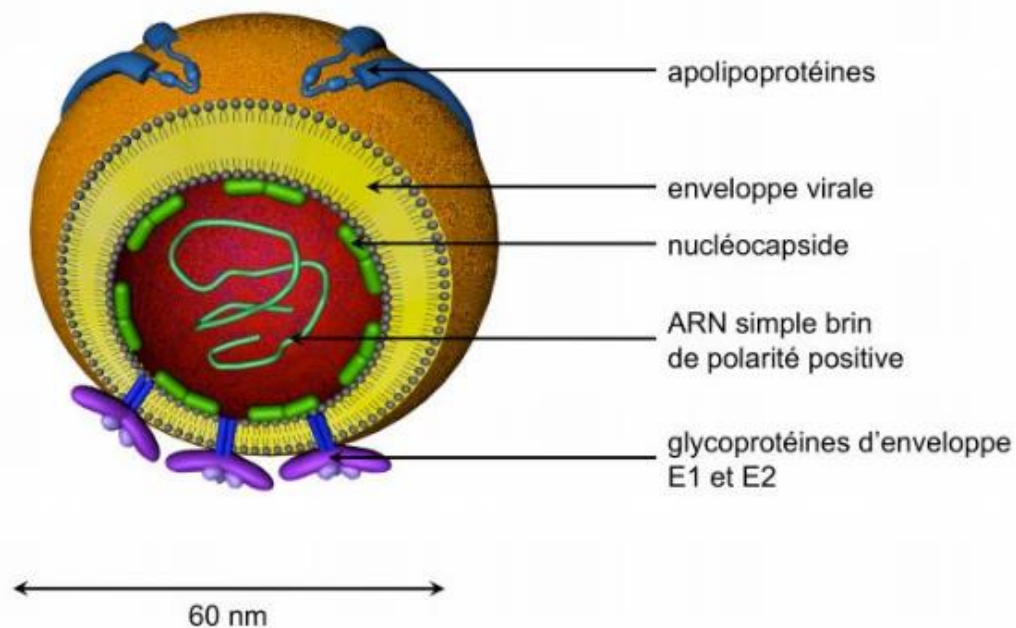


Figure 7: Représentation schématique d'une particule de VHC (Calland et al., 2012)

1.4.2.1.2.2. Génome du VHC et principales fonctions de ses protéines

Le génome du VHC est un ARN monocaténaire de polarité positive constitué d'environ 9,6 kilobases. Ce génome est composé d'un cadre de lecture ouvert (*Open Reading Frame* ou ORF) encadré par les régions no-codantes (*Un-Translated Region* ou UTR) aux extrémités 3' et 5' fortement structurées et relativement bien conservées. L'ORF code pour la synthèse d'une polyprotéine (environ 3000 acides aminés) clivée pendant et après la traduction par les protéases virales et celles de la cellule hôte, ceci en 10 protéines finales (Chew et al., 2009). Ces protéines qui en résultent sont classées en 2 catégories à savoir d'une part les protéines structurales au nombre de 4 (la protéine de capsid, les deux glycoprotéines d'enveloppe (E1 et E2) et la protéine p7) et d'autre part les protéines non structurales (NS) au nombre de 6, assurant les fonctions enzymatiques nécessaires au cycle viral (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) (Figure 8). Les protéines structurales sont clivées par les

protéases cellulaires tandis que les protéines NS le sont par les protéases virales (Calland et al., 2012).

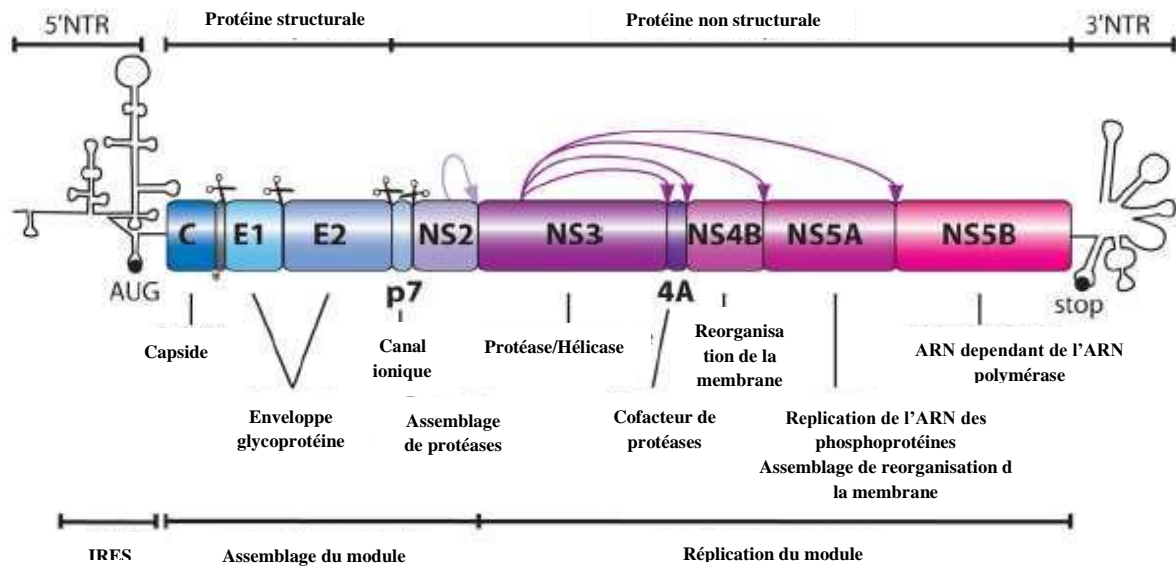


Figure 8: Organisation du génome viral du VHC (Lohmann & Bartenschlager, 2014).

Les protéines du VHC regroupées en protéines structurales et non structurales (NS) remplissent des fonctions précises dans le cycle viral. En effet, la protéine de capsidiforme, avec l'ARN viral, l'intérieur du virus, enveloppé par les glycoprotéines E1 et E2, toutes impliquées dans le processus d'entrée du VHC. La NS2 et la p7 interviennent dans l'assemblage complet du virus, tandis que la NS4A active la NS3 et cette dernière est impliquée dans la réplication du génome viral. La NS4B quant à elle induit le remodelage membranaire du réticulum endoplasmique de la cellule infectée. La NS5A est nécessaire à la réplication et à l'assemblage du virus alors que la NS5B est la polymérase virale ARN-dépendante (Lohmann & Bartenschlager, 2014).

1.4.2.1.2.3. Cycle viral du VHC

Les hépatocytes sont les cellules préférentiellement infectées par le VHC (Lerat et al., 1996). La multiplication du VHC dans ces hépatocytes inclut 3 principales étapes (Figure 9):

(1) L'entrée du virus (l'attachement, l'endocytose et la fusion) :

Après fusion des membranes de la vésicule d'endocytose et du VHC, la nucléocapside (qui contient l'ARN viral) est libérée dans le cytoplasme de la cellule.

(2) La réplication (implique la traduction et la synthèse des protéines virales puis la réplication de l'ARN génomique):

Le génome viral est alors traduit dans le réticulum endoplasmique rugueux et la polyprotéine formée est alors modifiée. En effet, cette poly-protéine est ensuite clivée sous l'action des protéases virales et cellulaires, en 10 protéines. Sous l'action de NS4B se forme le "*membranous web*" constituée de vésicules à double couche de membrane contenant les protéines non structurales et l'ARN du VHC, ainsi que des membranes du réticulum endoplasmique et des gouttelettes lipidiques 57C'est dans ce réseau qu'a lieu la réplication du génome viral médiée par NS5B qui produit un ARN intermédiaire à brin négatif, nécessaire pour produire de nouveaux ARN à brin positif. Ces derniers peuvent être à nouveau traduits pour former de nouvelles protéines virales ou servir de base à un nouveau cycle de réplication ou encore être intégrés dans les particules infectieuses nouvellement assemblées.

(1) La morphogénèse (l'assemblage, la maturation ou la sécrétion des virions et le relargage ou transmission cellule à cellule des virions néo-synthétisés) :

A la fin de la maturation post-traductionnelle, les protéines de la capsidie vont s'accumuler autour des gouttelettes lipidiques (LD) et les glycoprotéines E1 et E2 vont s'enchâsser dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) du fait de leur hydrophobie (Sarkar et al., 2014). La co-localisation des protéines de l'enveloppe et des protéines du complexe de réplication et la proximité avec la protéine C vont favoriser le bourgeonnement et la formation des virions dans la lumière du RE

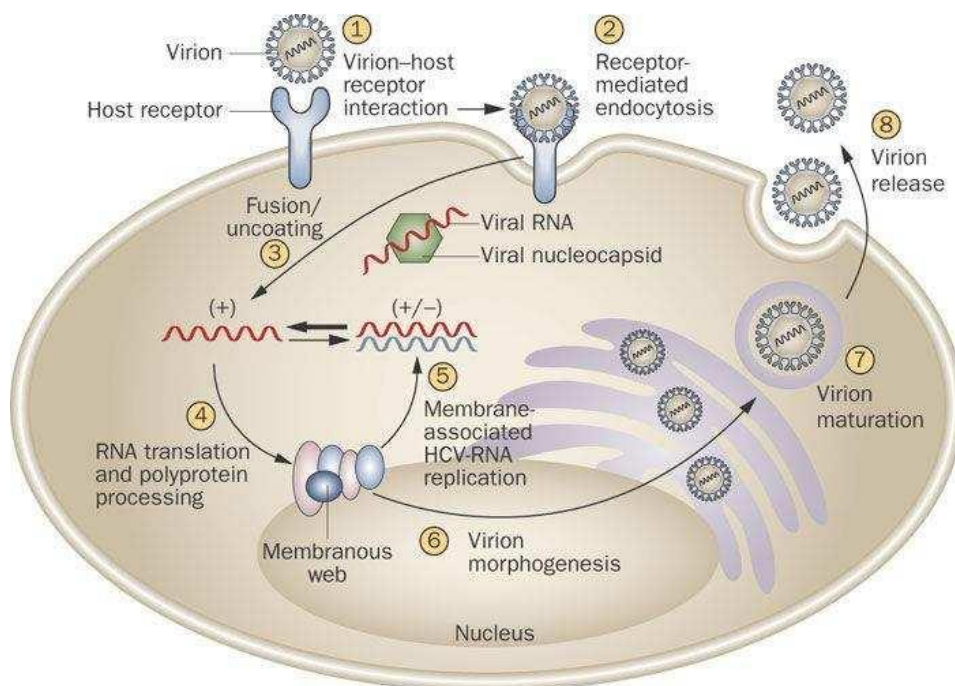


Figure 9: Cycle du virus de l'hépatite C (Pereira & Jacobson, 2009)

Le VHC se lie à différents récepteurs membranaires (1) qui vont entraîner son endocytose (2). Les membranes de la vésicule d'endocytose et du VHC vont fusionner libérant ainsi le virus dans la cellule (3). Là, il va être traduit une première fois et les protéines virales vont remodeler le réticulum endoplasmique (4) pour promouvoir sa réplication (5). Le virus va ensuite s'assembler dans la cellule (6) avant d'être maturé via les gouttelettes lipidiques (7) puis sécrété (8).

1.4.2.2. Les hépatites toxiques

Il s'agit des lésions de types variés provoquées par des produits dits hépatotoxiques et survenant dans des circonstances bien particulières.

Les hépatites toxiques sont dues pour la plupart à un certain nombre de substances telles que le tétrachlorure de carbone et d'autres solvants chimiques dits industriels (**Ortega-Alonso & Andrade, 2018**), des antalgiques (le paracétamol), des champignons (l'amanite phalloïde), le phosphore blanc, les herbicides (le paraquat), certains végétaux (le gin, le charbon à glu en Algérie), l'isoniazide, l'alcool et les aflatoxines. Ces diverses substances déterminent une hépatite cytolytique, pouvant entraîner la mort par insuffisance hépatocellulaire grave (**Lata, 2010**).

Dans la plupart des cas, ces composés sont biotransformés au niveau du foie en métabolites réactifs. Ces derniers endommagent les hépatocytes, entraînant ainsi l'hépatite dite toxique.

En cas d'hépatite toxique, les tests hépatiques montrent une augmentation des taux des aminotransférases et/ou des phosphates alcalines, et/ou du gamma glutamyltranspeptidase (**Bilgic et al., 2017; Hernández Marcos et al., 2016**).

1.5. Mécanismes généraux de dommage cellulaire

La lésion cellulaire est causée par les molécules réactives formées au cours du métabolisme. Ces métabolites toxiques réagissent avec les biomolécules avec pour conséquences la formation :

- soit des interactions non covalentes telles que la peroxydation lipidique, la génération des radicaux d'oxygènes réactifs (toxiques), des réactions causant la déplétion du glutathion et la modification des groupements sulfudryls.
- soit des interactions covalentes dont les cibles peuvent être l'ADN, les protéines, les peptides, les lipides et les glucides (**Chao et al., 2018; Rocco et al., 2014**).

Les systèmes biologiques sont le siège de production d'espèces réactives oxygénés tels que : O_2° , $^{\circ}OH$, ROO° , H_2O_2 et d'autres composés. Ces espèces réactives d'oxygène peuvent

créer au niveau des cellules des dommages pouvant conduire à la mort de la cellule (**Cavaliere et al., 2002**).

Outre la production issue du métabolisme, le nombre de ces espèces réactives, dont les demi-vies sont brèves, augmente suite à des irradiations diverses ou alors des facteurs environnementaux. Parmi ces espèces, on peut citer (**Thomson & Arthur, 1999**):

- le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroperoxyl (HO_2°) avec des demi-vies de l'ordre de la minute.
- le radical péroxyl (ROO°) et l'oxyde nitrique (NO°) avec des demi-vies de l'ordre de la seconde.
- le peroxynitrite ($ONOO^-$) avec une demi-vie de l'ordre de la milliseconde
- l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), l'oxygène singulet ($^1O_2^\circ$) et de radical alkoxy (RO°) avec des demi-vies de l'ordre de la microseconde.
- le radical hydroxyl (HO°) avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde.

L'augmentation de la formation de $O_2^{\circ-}$ et des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dérivées de $O_2^{\circ-}$ a été appelé stress oxydatif (**Wang et al., 2018**).

Le stress oxydatif peut être initié dans les hépatocytes par de nombreux xénobiotiques capables d'un cycle redox. Cependant, le radical $O_2^{\circ-}$ est un produit dérivé normal des processus consommant de l'oxygène dans divers compartiments cellulaires ($O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\circ-}$). L'anion superoxyde formé ($O_2^{\circ-}$) est rapidement converti en H_2O_2 sous l'action de la superoxyde dismutase (Figure 10).

Dans les mitochondries, sources les plus importantes de production (*in vivo*) des ERO (**Boveris & Cadenas, 1975; Chance et al., 1979; Loschen et al., 1971**), la réduction de l'oxygène en eau avec quatre électrons, qui a lieu au niveau des cytochromes oxydases, ne permet pas la sortie d' $O_2^{\circ-}$ et la formation ultérieure du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cependant, une sortie de H_2O_2 survient au site ubiquinone/cytochrome b (**Johnson et al., 1986**) (Figure 10).

Dans le cytosol, les enzymes à flavoprotéines présentes sont capables d'une réduction univalente de l'oxygène. L'une d'entre elles, la xanthine oxydase, jouerait un rôle critique dans la lésion hépatique (Figure 10).

Dans le réticulum endoplasmique, de l' $O_2^{\circ-}$ fait à partir du cycle du cytochrome P_{450} et est sous l'action de flavoprotéines impliquées dans la réaction à mono-oxygénase

(Gustafsson, 1980) (Figure 10). Les substrats de mono-oxygénase peuvent accélérer la vitesse de base de formation de H_2O_2 dans les microsomes hépatiques.

Dans les peroxysomes, certaines enzymes permettent la production de H_2O_2 sans passer par O_2^- (X.-F. Chen et al., 2018; D. van der Vlies et al., 2003) (Figure 10).

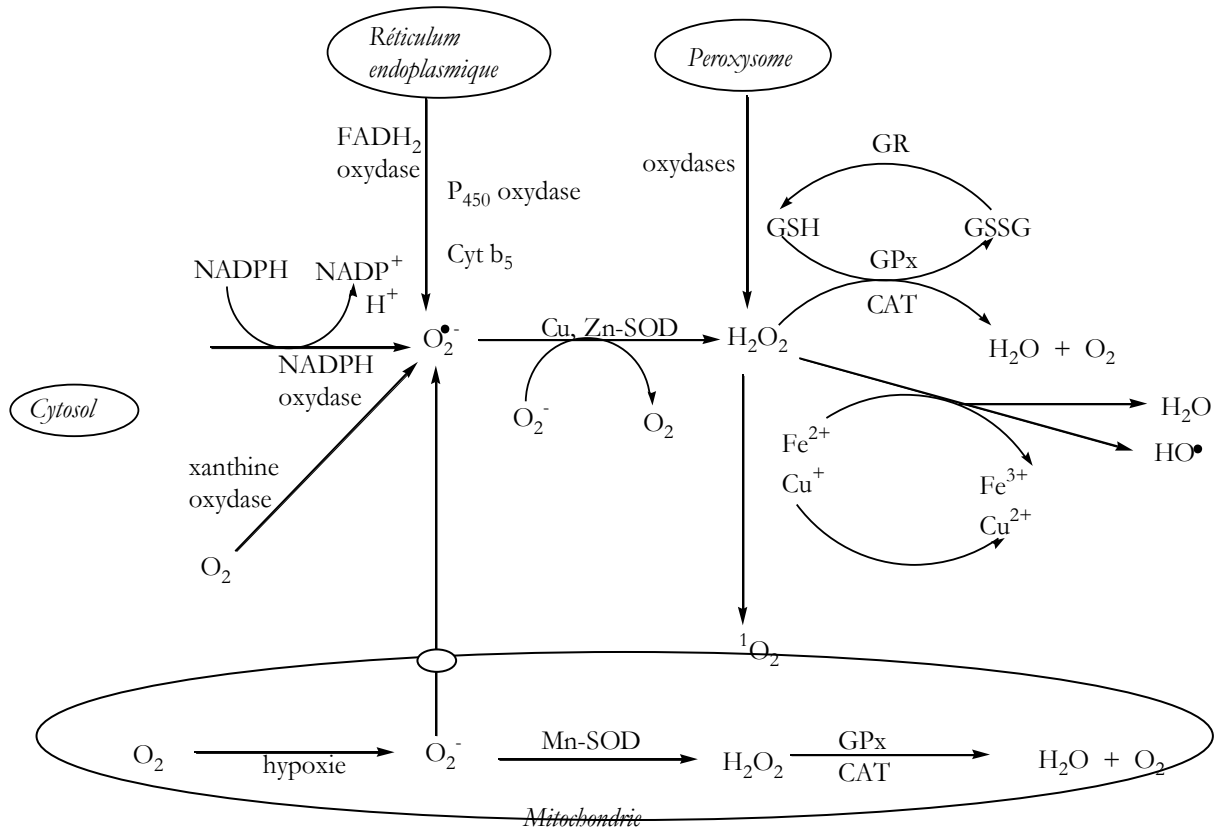
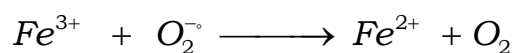
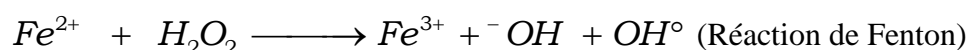


Figure 10: Formation des espèces réactives d'oxygène (ERO) et mécanisme de défense contre les dommages dues aux ERO (Van der Vlies et al., 2003)

CAT = catalase, GPx = glutathion peroxydase, GR = glutathion réductase, SOD = superoxyde dismutase, GSH = glutathion réduit, GSSG = glutathion oxydé.

Ni le radical $O_2^{\bullet-}$, ni H_2O_2 n'altèrent fortement l'intégrité cellulaire. Cependant, en présence de métaux de transition réduits (Fe^{2+} , Cu^{2+}), le radical hydroxyl HO^\bullet , hautement réactif, est formé à partir de H_2O_2 et de $O_2^{\bullet-}$ par la réaction d'Haber-Weiss (Kehrer, 2000).





Le radical HO° attaquera virtuellement toutes les molécules de son voisinage et peut conduire soit à une peroxydation, soit à une perturbation fonctionnelle des protéines. Lorsque H₂O₂ envahit le noyau et atteint un endroit où le fer ferreux est présent près de l'ADN, une lésion du matériel génétique peut aussi survenir, à l'origine d'une cassure des brins.

Les différentes lésions de la cellule peuvent conduire, s'il n'y a pas réparation, à la mort de celle-ci. Cette mort peut survenir par deux mécanismes distincts : la nécrose et l'apoptose. En plus, certains composés chimiques et mêmes certaines cellules du "soi" sont dites cytotoxiques pour la cellule car conduisant à la mort de celle-ci.

1.6. Méthodes expérimentales d'induction des hépatites toxiques

Plusieurs composés sont utilisés au laboratoire pour induire chez l'animal, *in vitro* et/ou *in vivo*, une hépatite ou d'autres hépatopathies. Les animaux d'expérience couramment utilisés sont le rat et/ou la souris dans le cas d'une étude *in vivo* et les hépatocytes primaires humain, de rat ou de souris et certaines lignées cellulaires d'hépatocyte humain sont utilisés pour les études *in vitro*.

Compte tenu de la panoplie d'agents toxiques pouvant induire ces maladies, seulement les agents dont les mécanismes d'action sont bien connus et couramment utilisés sont exploités. C'est ainsi que pour induire au laboratoire une hépatite toxique *in vitro* ou *in vivo*, le tétrachlorure de carbone (CCl₄) ou le paracétamol ou acétaminophène ou N-acétyl-p-aminophénol (APAP) sont généralement utilisés. Ces deux toxiques induisent les hépatites par les mécanismes différents.

1.6.1. Mécanisme moléculaire d'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone

Lorsque le CCl₄ est ingéré ou inhalé par accident, il subit un métabolisme activateur par clivage sous l'action de l'isoforme 2E1 du cytochrome P₄₅₀(CYP2E1) et aboutit au radical libre trichlorométhyl (°CCl₃) (Figure 11). Le radical °CCl₃ formé, réagit avec l'oxygène moléculaire (O₂) pour former un autre radical, le trichlorométhylperoxyl (°CCl₃O₂) qui est le métabolite réactif responsable de la toxicité du CCl₄. Ce métabolite provoque la déplétion du glutathion et l'inhibition des enzymes antioxydants avec pour conséquence une surproduction d'espèces réactives à l'oxygène (ERO). L'excès d'EOR et de °CCl₃O₂ initient par la suite le

acétyl-para-benzoquinone-imine (NAPBQI), le métabolite réactif responsable de la toxicité de l'APAP (Chao et al., 2018).

Lorsqu'une dose élevée de paracétamol est ingérée, les voies de conjugaison en dérivés glucuronides et sulfates deviennent saturées et celle du cytochrome P450 majoritairement utilisée. Dès lors, la "mixed function oxydase (MFO)" convertit le paracétamol en N-acétyl para benzoquinone imine (NAPBQI) qui est le principal métabolite réactif. L'excès de NAPBQI qui en résulte fixe les réserves de glutathion cellulaire (pouvant entraîner la déplétion du glutathion), se lie de manière covalente aux protéines spécialement celles de la membrane mitochondriale, causant le dysfonctionnement mitochondriale et le stress oxydatif (Jaeschke et al., 2003a). Ce stress oxydatif provoque la peroxydation des lipides membranaires avec pour conséquence la perte de l'intégrité membranaire.

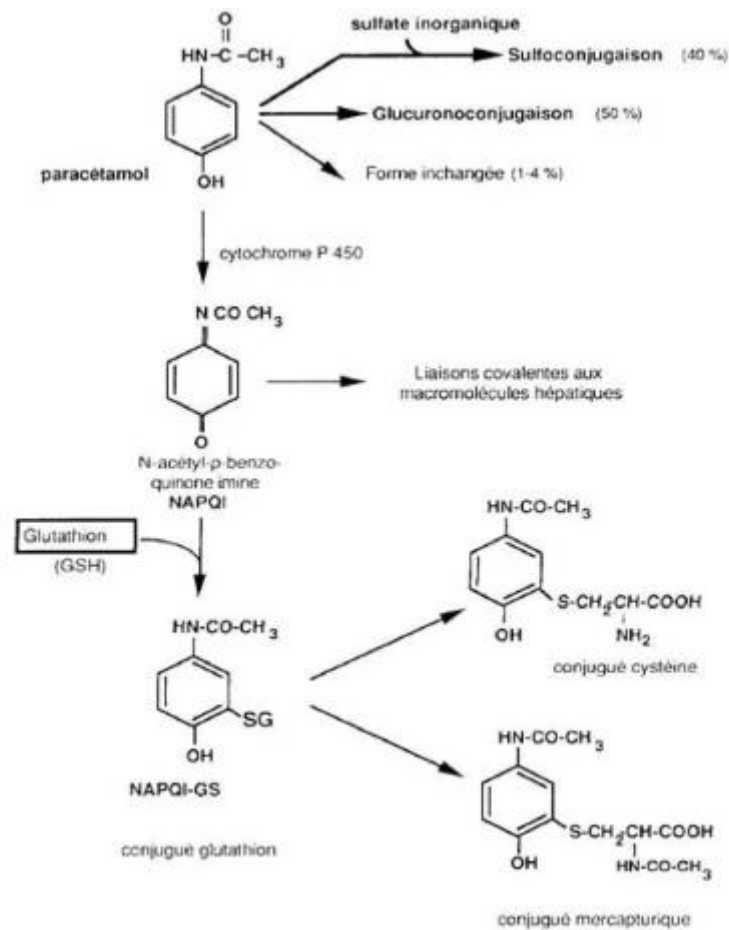


Figure 12: Métabolisme hépatique du paracétamol (Mégarbane, 2017)

1.6.3. Protocoles expérimentaux

Les protocoles d'utilisation de chacun des toxiques sont diversifiés.

Le CCl₄ est généralement dissout dans l'huile de maïs ou d'olive dans les proportions 1:3 v/v et est administré *in vivo* par voie intra péritonéale (i.p.) ou sous cutané (s.c.) aux doses d'intoxication variant de 0,3 à 0,7 ml/Kg et, de 0,05 à 0,07 ml/Kg de masse corporelle respectivement chez le rat et la souris. Le modèle d'hépatite induite par l'APAP quant à lui est induit per os (p.o.) aux doses de 300 mg/Kg et, 1 à 3 g/Kg de masse corporelle respectivement chez la souris et le rat.

Dans le cas de l'intoxication au CCl₄, l'hépatite est effective 24 heures après intoxication et est marquée par une élévation du taux sérique de l'enzyme ALAT de localisation principalement hépatique (**Jaeschke, 2015**). Dans le cas du paracétamol, l'hépatite s'installe généralement 6 à 12 h chez la souris et 24 à 48 h chez le rat après intoxication et est caractérisé par une élévation du taux sérique de l'enzyme ALAT une déplétion en glutathion, une modification chimique des macromolécules et un stress oxydatif.

In vitro, les meilleurs modèles cellulaires d'étude d'hépatite toxique en laboratoire sont les cultures d'hépatocytes primaires humains ou de souris car elles reproduisent quasi totalement la pathophysiologie *in vivo* de la plupart des toxiques utilisés pour l'induction de l'hépatite, parmi lesquels l'APAP et le CCl₄ (**Ramachandran & Jaeschke, 2018**). Cependant, les doses utilisées après culture d'hépatocytes sont variées. Nous pouvons mentionner les doses de 15 mM (**Tsuji et al., 1994**) et de 4 mM pour le CCl₄.

Toutefois, quelles que soient les modèles cellulaires, une étude dose-réponse du toxique utilisé pour l'induction de l'hépatite en fonction de la densité des cellules doit être faite afin d'établir les conditions expérimentales adéquates permettant d'étudier les mécanismes de toxicité dudit toxique. L'hépatotoxicité de ces composés est généralement mise en évidence par une élévation du taux de transaminases sériques et une formation massive du malondialdéhyde (MDA), un produit terminal de la peroxydation des lipides membranaires (**Jaeschke, 2015**).

1.7. Modèles expérimentaux d'étude du virus de l'hépatite C

Plusieurs modèles d'exploration des différents aspects de l'infection virale *in vitro* et *in vivo* ont été mis sur pied de modèles.

Dans le cas des modèles d'étude *in vitro*, différents systèmes ont été développés, l'objectif étant d'explorer efficacement les étapes du cycle viral que sont: l'entrée, la

réplication, l'assemblage et la libération des virions. Il s'agit entre autres des réplicons subgénomiques et des particules virales infectieuses produites en culture cellulaire (HCVcc).

Ces deux systèmes représentent des outils importants pour l'identification de nouveaux agents inhibiteurs du VHC, mais limités par le type cellulaire et les souches virales qui peuvent être étudiées.

1.7.1. Les réplicons subgénomiques

Les réplicons subgénomiques sont par définition des molécules d'ARN capables d'auto-amplification. Dans le cas du VHC, il s'agit d'ARN chimériques capables de répliquer une partie du génome viral. Ils ont été développés pour la première fois par **(Lohmann & Bartenschlager, 2014)** à partir d'un isolat viral du VHC de génotype 1b (isolat Con1).

Les réplicons subgénomiques du VHC sont construits en enlevant du génome viral, les gènes structuraux, p7 et parfois NS2; puis en insérant à l'extrémité 5' non codante, un marqueur de sélection qui est un gène de résistance à la néomycine (antibiotique encore appelé G418). Ce gène qui est celui de la néomycine phosphotransférase ou *neo* est sous la dépendance de l'IRES (Séquence de l'ARNm sur laquelle se fixe le ribosome pour initier la traduction) du VHC. A l'extrémité 3' du gène *neo*, on insère l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) qui contrôle l'expression des gènes non structuraux du VHC (NS3-NS5B). Une fois les réplicons construits, on les introduit dans les cellules Huh-7 (lignées humaines d'hépatocytes cancéreux, hautement permissives au VHC) par transfection. On obtient alors 3 types de cellules: des cellules sans réplicons, des cellules avec des réplicons incapables de s'auto-amplifier et des cellules avec des réplicons capables d'auto-amplification. Seules les cellules Huh-7 capables de supporter la réplication des ARN subgénomiques transfectés vont se multiplier sur milieu G418 et pourront ainsi être utilisées (Figure 13) **(Steinmann & Pietschmann, 2013)**.

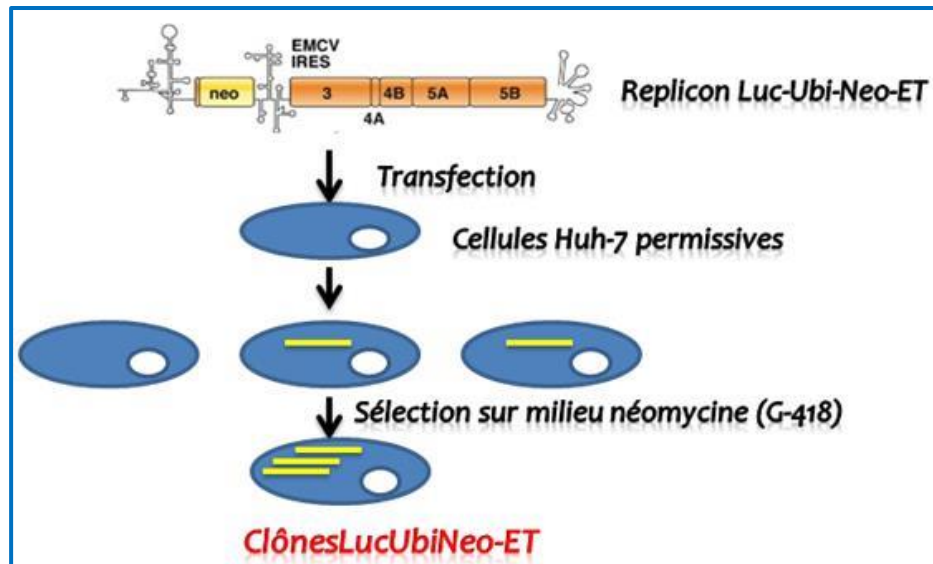


Figure 13: Le système réplicon subgénomique du VHC (Steinmann & Pietschmann, 2013)

Après l'introduction des systèmes réplicons en 1999, d'autres réplicons subgénomiques ont été développés. On peut citer entre autres :

- des réplicons subgénomiques contenant des gènes rapporteurs qui ont facilité l'exploration des mécanismes de réplication du VHC comme le gène de la luciférase (**Frese et al., 2002**), des protéines fluorescentes comme la *green fluorescent protein* (GFP) ou de la β -lactamase (**Steinmann & Pietschmann, 2013**) ;
- Des réplicons subgénomiques générés à partir d'autres isolats du VHC qui ont pu être construits avec des souches virales de génotype 1, 2, 3 et 4.

1.7.2. Système HCVcc ou particules virales infectieuses produites en culture cellulaire

Malgré les progrès réalisés avec les systèmes réplicons, le manque de production de virions en culture cellulaire était un inconvénient majeur. Ceci à cause des mutations adaptatives qui bloquent l'assemblage viral. Cet inconvénient va être dépassé avec l'identification d'un isolat viral d'origine asiatique capable de générer des virions infectieux. En effet, en 2001, une souche du VHC de génotype 2a a été isolée chez un patient japonais atteint d'hépatite fulminante. Cette souche a été baptisée clone *Japanese fulminant hepatitis-1* (JFH-1) et utilisée pour la construction d'un ARN subgénomique (**Kato et al., 2015**). Des essais en culture cellulaire vont montrer que cet ARN subgénomique de JFH-1 se réplique efficacement dans les cellules de la lignée Huh-7. En 2005, trois équipes de chercheurs ont tenté directement d'électroporer les cellules Huh-7 avec de l'ARN génomique du clone JFH-1. Les résultats de leurs travaux ont montré que cette électroporation entraînait la production de

particules virales infectieuses capables de coloniser des hépatocytes naïfs, d'où la naissance du modèle VHCc (Xu & Zhong, 2016).

Des améliorations ont été opérées par la suite sur ce modèle afin d'augmenter laproduction des particules VHCc. C'est ainsi que des ARN chimériques intra- et inter-génotypiques ont été développés (Figure 14). Ces chimères ont été conçues en remplaçant lesséquences core à NS2 de JFH-1 par celles d'autres isolats de mêmes génotypes ou de génotypes différents. De plus, afin de faciliter la détection des cellules infectées et de quantifier le niveau d'infection, des clones JFH-1 exprimant un gène rapporteur comme la GFP ou la luciférase ont été développés (Vieyres & Pietschmann, 2013). L'avantage de cemodèle est qu'il permet désormais d'étudier chaque étape du cycle viral complet du VHC. Il a permis de réaliser des progrès dans la compréhension des étapes d'assemblage et de sécrétion,de compléter et/ou confirmer les résultats obtenus avec les autres systèmes d'étude sur l'étaped'entrée et le rôle des récepteurs cellulaires impliqués dans cette étape.

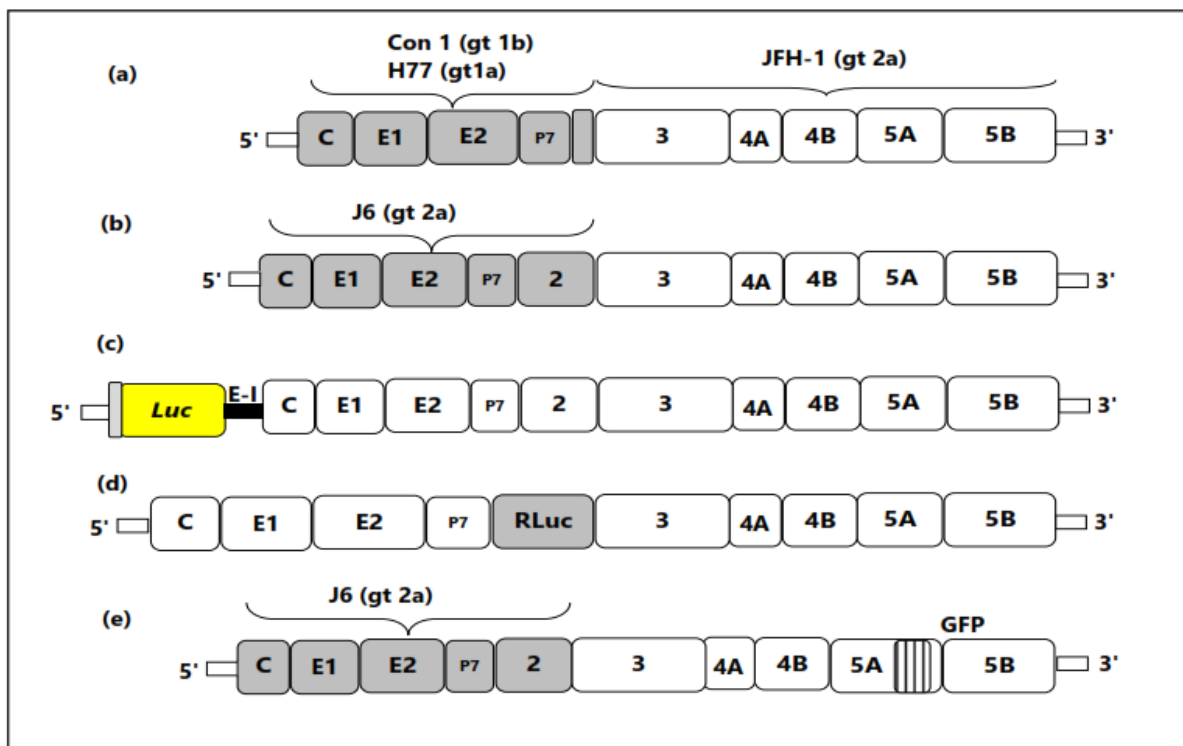


Figure 14: structure de quelques génomes dérivés de JFH-1(Woerz et al., 2009)

(a) Structure d'un génome chimérique inter-génotypique formé entre les séquences NS3-5B de JFH-1 (génotype 2a) et les séquences core à la portion transmembranaire de NS2 des isolats H77 (génotype 1a) ou Con1 (génotype 1b). (b) Structure d'un génome chimérique intragénotypique formé entre les séquences core à NS2 de l'isolat J6 (génotype 2a) et les séquences NS3-5B de l'isolat JFH-1. Ce génome est aussi appelé Jc1. (c) Structure d'un réplicon génomique bicistronique rapporteur de JFH-1. La région 5'NTR dirige la traduction du gène de la luciférase (Luc) pendant que les gènes viraux sont sous la dépendance de l'IRES de l'ECMV (E-I). (d) Structure d'un génome monocistronique rapporteur de JFH-1. Tous les gènes du VHC ainsi que le gène de la luciférase Renilla (RLuc) sont tous sous la dépendance de la région 5'NTR du VHC. (e) Structure d'un génome monocistronique rapporteur de Jc1. Les gènes du VHC ainsi que ceux de la protéine fluorescente verte (green

fluorescent protein ou GFP) sont contrôlés par la région 5'NTR du VHC.

Par ailleurs, il est important de noter que plusieurs modèles d'étude *in vivo* utilisant des animaux sont aujourd'hui utilisés. Ces types vont du modèle chimpanzé aux souris humanisées, plus accessibles.

1.8. Mécanismes de défense contre les oxydations et traitement des hépatopathies

1.8.1. Mécanismes généraux de défense contre les oxydations

La lutte contre les oxydations peut être résumée de façon générale par la défense endogène par des enzymes et l'utilisation des antioxydants.

1.8.1.1. Défense par l'intermédiaire des enzymes

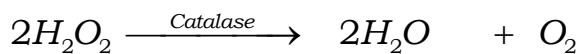
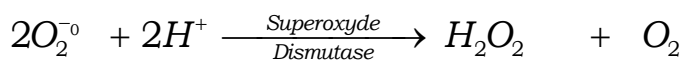
Certaines enzymes se comportent comme antioxydants en agissant de trois manières (Dalton et al., 1993):

- *Par consommation de l'oxygène*

Les enzymes de la classe des oxydases utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons. On peut citer entre autres la glucose oxydase, la xanthine oxydase, la thiol oxydase, la galactose oxydase,

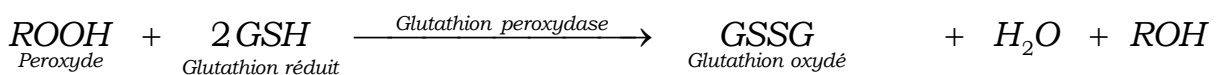
- *Par destruction des espèces réactives oxygénés*

Il s'agit de l'œuvre des enzymes telles que la superoxyde dismutase et la catalase. Les réactions qu'elles catalysent sont les suivantes :



- *Par catalyse de la destruction des peroxydes lipidiques*

La glutathion peroxydase peut catalyser la réduction des hydroperoxydes couplés à l'oxydation du glutathion suivant l'équation :



Le glutathion, qui est un tripeptide synthétisé à partir de l'acide glutamique, la cystéine et la glycine, participe au mécanisme de défense des systèmes biologiques (Figure

15) contre les radicaux libres et les métabolites toxiques (Reed, 1990; Nagalakshmi & Prasad, 2001;).

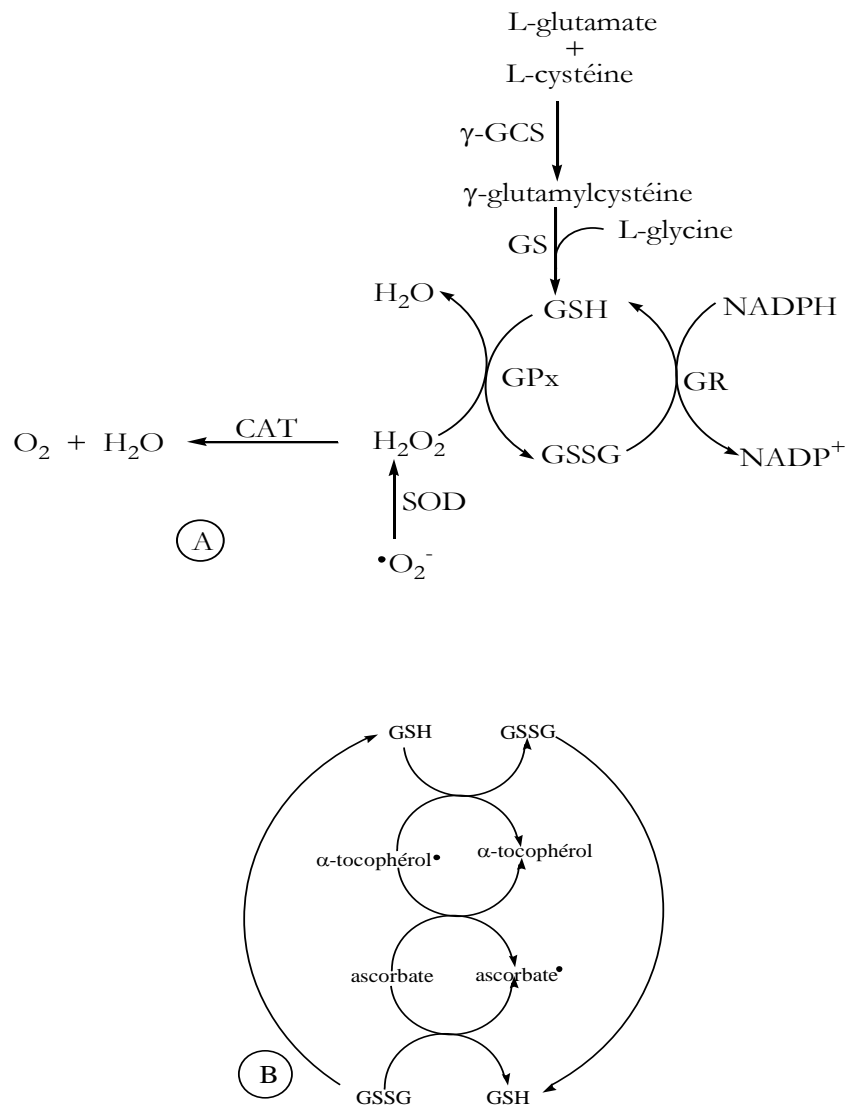
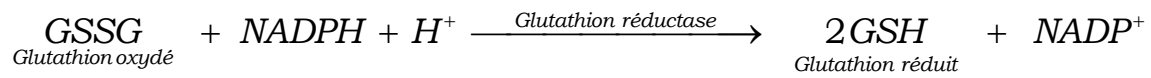


Figure 15: Relations entre les enzymes-oxydants et le glutathion (Van der Vlies et al., 2003).

γ -GCS = γ -glutamylcystéine synthétase, GS = glutathion synthétase, GPx = glutathion peroxydase, GR = glutathion réductase, SOD = superoxyde dismutase, CAT = catalase.

En cas de déplétion du taux de glutathion cellulaire d'environ 20 à 30%, il s'installe un déséquilibre entre prooxydants et antioxydants en faveur des premiers (Nagalakshmi & Prasad, 2001). Ce déséquilibre définit le stress oxydatif (Sies, 2000; Storz & Imlayt, 1999).

Pour protéger les biomolécules contre les oxydations favorisées par ce phénomène, le glutathion réduit est régénéré par la glutathion réductase suivant l'équation :



Dans tous les cas, on note une relation claire entre les enzymes - oxydants et le glutathion (Figure 15).

1.8.1.2. Les antioxydants

L'utilisation des antioxydants permet de minimiser ou de limiter les phénomènes d'oxydation (Sies, 1993).

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories, selon les mécanismes spécifiques de lutte contre l'oxydation. C'est ainsi qu'on distingue :

- Les antioxydants primaires ou antiradicalaires : ils sont capables d'interrompre la chaîne autocatalytique en bloquant les radicaux libres par transfert d'un radical (**Ahmadipour et al., 2015**) ;

- Les antioxydants secondaires dits préventifs : ils sont capables de retarder l'oxydation par des procédés autres que l'interruption de la chaîne d'autooxydation ou tout simplement d'empêcher la production des radicaux libres, à l'origine des réactions d'oxydation. Dans ce groupe, il existe des facteurs endogènes majeurs utilisant divers mécanismes : ce sont les réducteurs et les chélateurs de métaux (**Van der Vlies et al., 2003**).

- Les antioxydants d'origine naturelle: ils sont très abondants dans le monde végétal (**Chalchat et al., 1997**). A cause de leur absence ou de leur faible toxicité pour la plupart, ils sont recommandés pour la lutte contre les phénomènes d'oxydation (**Aruoma et al., 2002**). On peut les regrouper en cinq grandes familles à savoir Les composés phénoliques, les dérivés dicétoniques actifs par la présence conjointe des fonctions cétone et phénol, l'acide ascorbique ou vitamine C agissant principalement comme réducteur de l'oxygène, les caroténoïdes dont l'activité antioxydante peut s'expliquer par leur capacité à désactiver l'oxygène singulet et les composés azotés, parmi lesquels les alcaloïdes, certains acides aminés (méthionine, proline, arginine, cystéine et thréonine) et l'ADN dont les propriétés antioxydantes sont synergistes à celle de la vitamine E.

1.8.2. Traitement des hépatites et des autres hépatopathies

Les traitements curatifs proposés aux patients atteints d'hépatites ou d'autres hépatopathies sont de deux ordres ; ceux proposés par la médecine moderne, et les traitements à base de plantes médicinales.

1.8.2.1. Médecine moderne

1.8.2.1.1. Traitement de quelques syndromes

En cas du déficit albuminique, les perfusions d'albumine humaine sont sollicitées, mais ce traitement est temporaire et présente également des inconvénients (réactions fébriles, surcharge volumique avec œdèmes pulmonaires,).

Le traitement du syndrome de l'insuffisance hépatocellulaire fait souvent appel à l'administration de la vitamine K₁, le tolbutamide qui a montré une amélioration à court terme et le glutathion qui semble avoir plus d'effet. L'azotioprine est utilisé contre les syndromes inflammatoires des cirrhoses. Les cholérétiques sont par ailleurs utilisés et permettent de capter les sels biliaires dans le tube digestif, évitant ainsi leur réabsorption.

1.8.2.1.2. Traitement des hépatites toxiques

En général, s'agissant des hépatites médicamenteuses ou toxiques, le traitement peut consister en l'arrêt de la prise du médicament ou de l'exposition au toxique en cause. Cet arrêt entraîne une amélioration progressive en ce qui concerne les formes mineures. Pour les formes majeures, de nombreuses tentatives thérapeutiques sont entreprises en fonction des symptômes. Ainsi, les corticoïdes sont administrés à la dose journalière de 20 à 30 mg et réduite de 5 mg tous les 8 à 15 jours, jusqu'à la dose minimale nécessaire pour obtenir une normalisation des transaminases sériques. L'utilisation de l'azathioprine à la dose de 50 à 100 mg par jour permet aussi de renforcer l'efficacité des corticoïdes et d'en réduire la posologie. L'usage des diurétiques comme le fucosémide isolément ou en association est parfois nécessaire.

Dans les cas d'intoxications sévères au paracétamol ou au tétrachlorure de carbone, le N-acétyl-cystéine, un précurseur du glutathion cellulaire est généralement administré par voie orale ou intraveineuse. Cependant, il présente l'inconvénient qu'il doit être administré dans les 8 h qui suivent l'intoxication (**Bebarta et al., 2010**). En somme, le traitement consiste en une administration des produits ayant une action généralement détoxiquante.

Ainsi, les corticoïdes sont administrés à la dose journalière de 20 à 30 mg et réduite de 5mg tous les 8 à 15 jours, jusqu'à la dose minimale nécessaire pour obtenir un état général satisfaisant, une normalisation des transaminases et du chiffre des gamma globulines.

Cas spécifique de la silymarine

La silymarine est extraite des fruits de *Silybum marianum* (Compositae) et est utilisée en thérapeutique comme agent hépatoprotecteur de référence grâce à ses activités antihépatotoxiques. En effet, la silymarine s'est avérée efficace lors de son utilisation dans le traitement des pathologies très proches du dommage hépatique, incluant la cirrhose, l'hépatite, les nécroses et les maladies médicamenteuses et alcooliques. Elle agit par son habileté à inhiber les facteurs responsables de dommage hépatique couplée à l'action des facteurs stimulant la production de nouvelles cellules hépatiques, en remplacement de celles usées.

En somme, la silymarine est d'une part un agent protecteur effectif du foie, son hépatoprotection étant attribuée à son habileté à induire une augmentation de la concentration intracellulaire du glutathion, substance requise pour les réactions de détoxification des cellules hépatiques ; d'autre part, elle est un agent de régénération cellulaire.

1.8.2.1.3. Traitement de l'hépatite virale C

En ce qui concerne les hépatites virales, les interférons sont utilisés en clinique pour leurs traitements. C'est ainsi que les interférons α sont utilisés pour le traitement de l'hépatite B alors que la forme α -21 est utilisée pour le traitement de l'hépatite C. L'un des problèmes liés à l'utilisation l'IFN α est sa faible stabilité dans le sang qui nécessite une administration régulière. Par ailleurs, il n'est efficace que chez moins de 40 % des patients traités et ils présentent des effets secondaires indésirables tels que la fièvre, les maux de tête, la fatigue, etc... (Sarrazin et al., 2010; Sarrazin & Zeuzem, 2010; Schaefer & Mauss, 2008).

Une autre thérapie consiste à utiliser des agents antiviraux à action directes (DAAs). En effet et par définition, les DAAs ou *Direct-acting antiviral agents* sont des agents antiviraux qui ont une cible directe sur le virus. Aujourd'hui, la recherche pharmacologique contre l'hépatite C est de plus en plus tournée vers ces DAAs. Ces agents ciblant pour la plupart les protéines non-structurales du complexe de réplication, plus efficaces et mieux tolérés par les patients (Pawlotsky, 2013; Polyak et al., 2013). On distingue en effet: des inhibiteurs de protéase virale NS3/NS4A, des inhibiteurs de la protéine NS5A, des inhibiteurs de polymérase virale NS5B.

En somme, le traitement médicamenteux consiste en une administration des produits ayant une action soit détoxiquant, soit à visée hépatobiliaire, soit antivirale ou alors des produits qui peuvent rompre les ponts disulfures des protéines et du glutathion.

1.8.2.2. Médecine traditionnelle

L'utilisation de la phytothérapie dans la gestion des affections hépatiques aussi bien toxiques que virales est un fait en médecine traditionnelle, mais reste un problème dans le domaine médical à cause :

- du manque ou d'insuffisance de recherches démontrant l'efficacité réelle des plantes médicinales et rapportant leurs effets toxiques ;
- l'inexploitation des résultats des recherches menées qui restent pour la plupart au niveau des connaissances théoriques, mais non utilisés dans les systèmes de santé.

Plusieurs travaux ont rapporté l'effet des extraits de plantes sur le VHC. C'est ainsi que des extraits éthanoliques des feuilles de *Toona sureni* (Méliaceae), *Melicope latifolia* (Rutaceae), *Ficus Fistulosa* (Moraceae) et des tiges de *Melanopelis multiglandulosa* (Euphorbiaceae) ont été criblés sur des cellules de la lignée Huh-7.5 et des souches virales du VHC de 9 génotypes différents (1a-7a, 1b et 2b) et, ont montré une activité anti-VHC avec des concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀) de 13,9; 3,5; 15 et 17 µg/mL respectivement (**Wahyuni et al., 2013**). De même, sur le modèle HCVcc, l'activité des extraits de *Trichilia drageana* (Meliaceae), *Detarium microcarpum* (Caesalpinaceae), *Phragmanthera capita* (Loranthaceae) et *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) avec des CI₅₀ respectifs de 16,16; 1,42; 13, 17 et 2,33 µg/mL a été démontrée (**Galani et al., 2015; Galani et al., 2016**).

Toutes ces études et bien d'autres qui décrivent les activités des plantes médicinales ont permis de cribler celles ayant un fort potentiel anti-VHC.

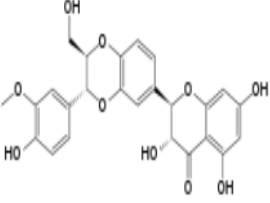
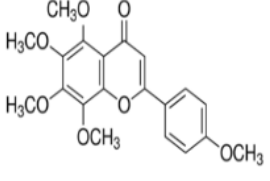
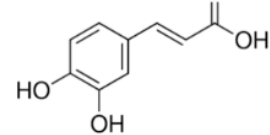
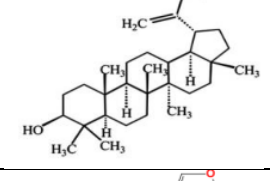
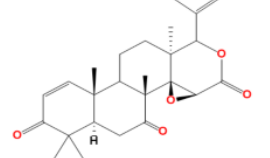
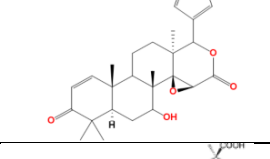
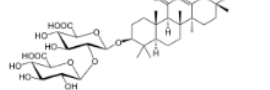
Les tableaux I et II ci-après nous présentent respectivement les plantes et les composés ayant un fort potentiel anti-VHC.

Tableau I: Plantes médicinales ayant un fort potentiel anti VHC

Espèces	Familles	Modèles expérimentaux	Toxiques	Paramètres modulés	Références
<i>Lycium barbarum</i>	Solanaceae	Souris (<i>in vivo</i>)	CCl ₄	CYP2E1, ALAT, SOD, CAT	(Xiao et al., 2012)
<i>Rosa laevigata</i>	Rosaceae	Souris (<i>in vivo</i>)	APAP	CYP2E1, ALAT, ASAT, GSH, SOD	(Liu et al., 2011)
<i>Sylibum marianum</i>	Asteraceae	Rat et souris (<i>in vivo</i>)	APAP, CCl ₄ , cisplatine	ALAT, ASAT, LDH, GSH, MDA, CAT, SOD	(Vargas-Mendoza, 2014)
<i>Rhinacanthus nasuta</i>	Leguminosae	Rat et souris (<i>in vivo</i>)	AFB -1	ALAT, ASAT, GSH	(Shyamal et al., 2010)
<i>Khaya grandifoliola</i>	Meliaceae	Rat et souris (<i>in vivo et in vitro</i>)	APAP, CCl ₄ , H ₂ O ₂	Nrf2, ALAT, ASAT, LDH, GSH, MDA, CAT, SOD	(Njayou et al., 2013, 2015, 2016)
<i>Entanda africana</i>	Mimosaceae	Cellules HC04			

ALAT: alanine aminotransférase; ASAT: Aspartate aminotransférase; APAP: acétaminophène; CCl₄: tétrachlorure de carbone; GSH: glutathion; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; LDH: lactate déshydrogénase; MDA: malonédialdéhyde; Nrf2: Nuclear factor erythroid-2 related factor-2 ; CYP2E1: Cytochrome P450 2E1

Tableau II : Composés chimiques ayant un potentiel anti VHC

Groupes chimiques	Noms	Structures	Toxiques, modèles expérimentaux	Paramètres modulés	Références
Flavonoïdes et composés phénoliques	Silibinine		CCl ₄ , souris (<i>in vivo</i>)	ALAT, ASAT, SOD, CAT, GSH, MDA, LDH	(Madrigal-Santillán et al., 2014)
	Tangeretin		Cisplatine, rats, (<i>in vivo</i>)	JNK, ALAT, ASAT, MDA	(Omar et al., 2016)
	Acide caféique		APAP, cellule L-02 (<i>in vitro</i>) souris (<i>in vivo</i>)	CYP2E1, Nrf2, ALAT, ASAT, SOD, CAT, MDA,	(Pang et al., 2015)
Terpénoides	Lupeol		APAP, rats, (<i>in vivo</i>)	Bax, Cyt c, capase 3 et 9, ALAT, ASAT, GSH	(Kumari & Kakkar, 2012)
	7-oxogedunin		D-galactosamine, souris, (<i>in vivo</i>)	ALAT, ASAT, MDA, SOD, CAT	(Ninomiya et al., 2016)
	7-deacetoxy-7-oxogedunin				
Saponine	Acide glycyrrhizique		CCl ₄ , souris (<i>in vivo</i>)	Nrf2, ALAT, SOD, CAT, MDA, GSH	(Graebin, 2017)

ALAT: alanine aminotransférase; ASAT: Aspartate aminotransférase; APAP: acétaminophène; CCl₄: tétrachlorure de carbone; GSH: glutathion; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; LDH: lactate déshydrogénase; MDA: malonedialdehyde; Nrf2: Nuclear factor erythroid-2 related factor-2; CYP2E1: Cytochrome P450 2E1; Bax: Bcl-2 associated X protein; Cyt c: Cytochrome C; JNK: c-Jun N-terminal kinase.

1.9. Présentation de la plante médicinale investiguée (*Desmodium adscendens*) et des travaux antérieurs

L'origine du nom du *Desmodium adscendens* provient du grec "desmos", qui signifie «lien» ou «faisceau», en allusion aux étamines qui se réunissent en tube à leurs extrémités, et de "adscendens", qui représente les propriétés des parties aériennes à ascensionner les troncs des palmiers à huile. Cette plante médicinale est bien connue dans les lieux humides et ombragés des régions tropicales et subtropicales d'Amérique, d'Afrique et d'Inde, où elle est utilisée de manière intensive en médecine traditionnelle.

Ses tiges minces, recouvertes de poils fins, sont longues et rampantes. Les feuilles alternes sont composées de trois folioles obovales ; la foliole centrale est plus développée que les deux autres folioles latérales. Les fleurs, de petite taille et de couleur blanche à violet clair, donnent naissance à des fruits, des gousses articulées de couleur verte (Tubéry et al., 2015).

Le *Desmodium adscendens* est une plante herbacée bisannuelle de la famille des Fabacées. Les parties employées sont les parties aériennes (tiges et feuilles). En Afrique et dans le monde, le *Desmodium adscendens* est utilisé par les tradipraticiens pour diverses affections hépatiques (Tableau III).



Photographie 1 : *Desmodium adscendens* (Tubéry et al., 2015)

L'analyse des principes actifs révèle une concentration de saponines, d'anthocyanes et de flavonoïdes. La plante est aussi riche en polyphénols, en tanins et en terpenoïdes ; les acides gras insaturés y sont présents dans une concentration maximale de 3%.

L'action du *Desmodium adscendens*, spécialement dans l'hépatoprotection, relève de la synergie entre plusieurs molécules. Celles qui sont les plus actives sont : Les flavonoïdes (vitexine et isovitexine), les saponosides triterpénoïdiques : soyasaponines (soyasaponines I et III, dehydrosoyasaponine I) et les dérivés de la tryptamine (Magielse et al., 2013b).

L'usage traditionnel du *Desmodium adscendens* contre l'épilepsie a suscité une recherche à l'INSERM, CNRS de Montpellier. DA supprime la phase tonique de convulsion ainsi que la mortalité induite selon un mode dose-dépendant sur des souris intoxiquées au Pentylène-Tétrazole (PTZ).

L'étude menée à l'Université de Metz a montré l'absence de toxicité du *Desmodium adscendens* (CIT, 1990). Les tests effectués au Centre International de Toxicologie (Evreux, France) ont montré :

- La négativité du test du micronoyau sur la souris (*Desmodium Adscendens* – « Test du micronoyau chez la souris » (CIT, 1990).
- La négativité du test d'Ames (*Desmodium Adscendens* – « Essai de mutation reverse par le test d'Ames » (CIT, 1990).

Ces deux derniers tests éliminant la possibilité de cancérogène.

Tableau III: Utilisation de *Desmodium adscendens* en Afrique et dans le monde

Localité	Noms vernaculaires	Utilisations ethnobotaniques et méthode d'administration	Référence
Région du Centre (Cameroun)	Owondo bekon	<ul style="list-style-type: none"> - Antidote général contre la morsure de serpent. - Le jus de feuilles est appliqué sur la morsure de serpent élargie 	Noumi, 2004
Sud de l'Ouganda	MutasukkaKkubo	<ul style="list-style-type: none"> - Aide à la formation de pot pour les enfants. - Infusion de jeunes feuilles (200 ml) est administrée par voie orale une fois par jour - La décoction se boit pour éliminer les sorts 	Ssegawa & Kasenene, 2007
Cameroun	Tombolombo	<ul style="list-style-type: none"> - Les feuilles sont utilisées pour ne pas attraper froid - Soulage les douleurs abdominales et dorsales; - arrête les douleurs abdominales post-partum; - soulage les troubles digestifs (flatulence, brûlures d'estomac et mal estomac); et contre les infections vaginales. - Décoction ou infusion des feuilles, la plante entière et les racines sont administrées par voie orale 	Sandberg et al., 2005
Est du Nicaragua	Strong back		
Est du Nicaragua Afrique centrale occidentale	Burbur, Strang-back	<ul style="list-style-type: none"> - La décoction ou la perfusion est administrée par voie orale à traiter les effets secondaires causés par les morsures de serpent - Au Ghana, la décoction de plantes sert à traiter l'asthme et d'autres maladies associée à un muscle lisse contraction. - Au Congo, les guérisseurs l'utilisent dans la gestion de plusieurs maladies, y compris la fièvre, la douleur et épilepsie. - Au Mato Grosso, la plante est utilisée uniquement dans le traitement de l'inflammation de l'ovaire 	(N'gouemo et al., 1996b)

**CHAPITRE II : MATERIEL
ET METHODES**

2.1. Matériel

2.1.1. Le matériel végétal

Les feuilles de *Desmodium adscendens* ont été fraîchement récoltées à Sa' a (Département de la Lekié, Région du Centre-Cameroun) avant la floraison (novembre 2012) et après la floraison (mai 2013). L'identification botanique des plantes a été effectuée à l'herbier national du Cameroun (IRAD, Yaoundé), où les spécimens de référence sont conservés sous le numéro 10259 / SRF Cam.

2.1.2. Les animaux d'expériences

Les expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont été conduites en utilisant comme animaux d'expériences des rats mâles albinos adultes de souche *Wistar*. Ces animaux logés dans des cages en plastique proviennent de l'animalerie du Département de Biochimie, de l'Université de Yaoundé I et nourris avec une alimentation standard dont la composition est indiquée en annexe. L'eau et la nourriture étaient données *ad libitum*.

2.1.3. La lignée cellulaire Huh-7

C'est une lignée cellulaire d'hépatomes humains qui a été isolée pour la première fois en 1982 chez un patient japonais de 57 ans atteint d'une tumeur de foie (**Nakabayashi et al., 1982**). Elle est hautement permissive au VHCet utilisée pour les tests antiviraux.

Les cellules Huh-7 ont été cultivées sur milieu DMEM supplémenté avec du glutamax-I et 10% de sérum de veau fœtal inactivé, tous fournis par Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Allemagne. Elles se multiplient en monocouche dans des plaques de culture ou sur boîtes de pétri. Les passages ont été effectués tous les 3 à 4 jours après l'obtention de cultures confluentes.

2.1.4. Les systèmes réplicons subgénomiques LucUbiNeo-ET

Ces systèmes réplicons sont des cellules issues de la lignée Huh-7 et qui ont été transfectées de manière stable avec un réplicon subgénomique de souche Con1 (génotype 1b) du VHC. Ce réplicon porte au total 3 mutations adaptatives (2 dans la région NS3 et 1 dans la région NS4B) qui sont destinées à accroître son potentiel réplicatif en culture cellulaire. Ce sont des systèmes non-infectieux qui ont été utilisés ici pour cribler l'effet des extraits de plantes sur l'étape de réplication du VHC. Dans ce cas, il s'est agi des cellules LucUbiNeo-ET dont la carte génétique est présentée à la figure 16 ci-dessous.

En effet, la lignée LucUbiNeo-ET dérive de Huh-7 et contient un réplicon du VHC Con1 modifié (**Lohmann et al., 1999**). Le gène de la luciférase de la luciole *Photinus pyralis*, gène rapporteur qui a été inclus, se retrouve en plus vers l'extrémité 5', (**Krieger et al., 2001**). Ceci permet la détection de la réplication virale par dosage de l'activité de luciférase. Les

cellules LucUbiNeo-ET ont été cultivées dans du DMEM contenant 10% de SVF, 1% de pénicilline / streptomycine et G418 0,25 mg / mL.

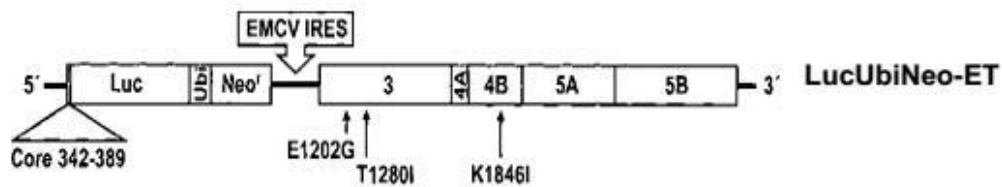


Figure 16: Carte du réplicon subgénomique LucUbiNeo-ET (Frese et al., 2002)

Le réplicon LucUbiNeo-ET est un réplicon subgénomique, bicistronique 1389/NS3-3' dérivé du réplicon Con1-ET et qui est composé d'une région 5'NTR, plus les nucléotides 342-389 de la région codant le core, le gène Luc (codant pour la luciférase de *Photinus pyralis*), le gène de l'ubiquitine, le gène neo, codant la neomycine phosphotransférase qui est un marqueur de sélection, l'IRES de l'ECMV qui dirige la traduction des protéines non structurales du VHC, NS3-5B et la région 3'NTR. Les flèches indiquent les positions des MAR.

2.1.5. Les particules virales : les HCVcc (virus infectieux produits en culture cellulaire)

Le système utilisé est constitué d'un virus chimérique de souche JFH-1 dans lequel l'épitope A4 de la glycoprotéine E1 de génotype 1a a été reconstitué (Goueslain et al., 2010). Cet épitope facilite la détection du virus dans la cellule infectée par immunofluorescence indirecte comme décrite par (Rouillé et al., 2006).

2.2. Méthodes

2.2.1. Préparation des extraits

Des feuilles fraîches de *Desmodium adscendens* ont été soigneusement lavées, rincées à l'eau distillée, séchées à température ambiante et broyées. La poudre obtenue (100 g) a été extraite par décoction avec 3 L d'eau distillée pendant 1 h. Après refroidissement, le mélange a été filtré avec du papier filtre Whatman grade 1 et le filtrat a été séché par lyophilisation pour obtenir des résidus de couleur vert foncé qui constituent les extraits aqueux de *D. adscendens*, nommés DA1 et DA2 respectivement pour les feuilles récoltées avant et après la floraison.

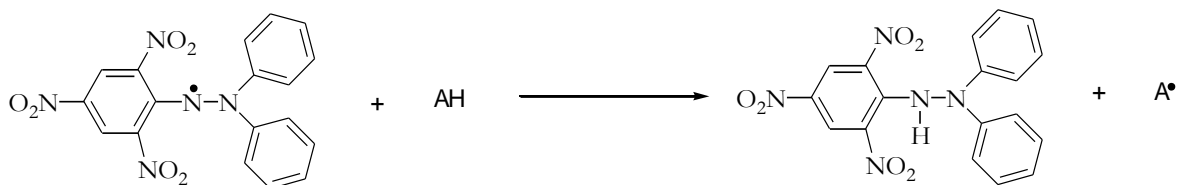
2.2.2. Evaluation *in vitro* des propriétés antioxydantes des extraits de *D. adscendens*

2.2.2.1. Activités antiradicalaires des extraits de plantes par les tests de piégeage des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et hydroxyles (HO⁻);

2.2.2.1.1. Piégeage du radical DPPH^o (Zengin et al., 2010)

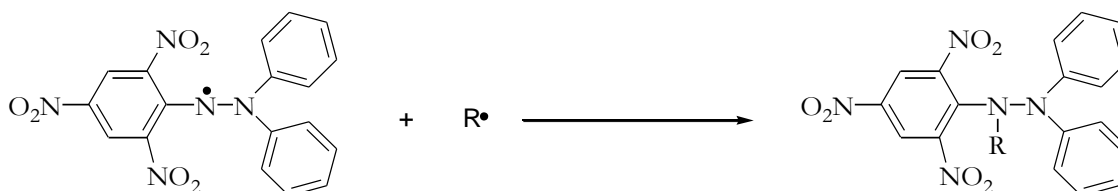
Principe

Le principe est basé sur la capacité de piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH^o d'une solution) en présence d'un antioxydant (AH) ou d'une entité radicalaire (R^o) suivant les équations de réactions :



radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

2,2-diphényl-1-picrylhydrazine



radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

2,2-diphényl-1-alkyl-1-picrylhydrazine

Ce piégeage entraîne la disparition de la couleur pourpre de la solution de DPPH qui est matérialisée par la décroissance de la DO à 517 nm et traduisant l'activité de la substance ajoutée.

Mode opératoire

Trois mille cent microlitres d'une solution méthanolique de DPPH 40 µg/ml, 50 µl d'extrait ou de vitamine C (témoin positif) ont été introduits dans les tubes à essai. Le mélange a été gardé à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante, puis l'absorbance a été mesurée à 517nm. La contribution de la coloration due à l'extrait de plante a été ensuite soustraite en utilisant 3100 µl d'une solution de méthanol additionnée à 50 µl de la solution.

Les différents pourcentages de piégeage ont été calculés selon l'équation 1 suivante

$$\%P = \frac{[(DO_{\text{témoin}} - (DO_{\text{essai}} - DO_{\text{blanc}}))] \times 100}{DO_{\text{témoin}}}$$

$DO_{\text{témoin}}$ = Absorbance en absence d'échantillon à tester (témoin négatif)

DO_{essai} = Absorbance en présence d'échantillon à tester

% P = Pourcentage de piégeage

DO_{blanc} = Absorbance en présence d'échantillon à tester mais sans DPPH

2.2.2.1.2. Activité de piégeage du radical OH° (Su et al., 2009)

Principe

En présence du $FeSO_4$ et du H_2O_2 , il se forme les radicaux hydroxyles (OH°). Ces derniers, couplés au salicylate de sodium forment un complexe violet qui absorbe à 562 nm.

L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la quantité d'anti radicalaire dans le milieu.

Mode opératoire

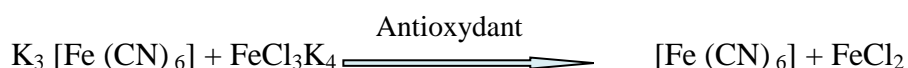
Dans chaque tube à essai ont été ajoutés successivement: 50 µl d'une solution d'extrait brut, ou de la vitamine C, 0,7 ml de FeSO₄ (3 mM), 1ml de H₂O₂ (1 mM), 1 ml d'eau distillée et 0,4 ml de salicylate de sodium (10 mM). Le mélange a été incubé à 37°C pendant 60 minutes et l'absorbance lue à 562 nm. La contribution de la coloration due à l'extrait de plantes a été soustraite en utilisant tous les réactifs sauf le salicylate de sodium qui a été remplacé par son solvant (eau distillée). Les différents pourcentages de piégeage ont été calculés suivant l'équation précédente.

2.2.2.2. Activités réductrices des extraits de plantes par les tests de réduction du ferricyanure de potassium et molybdate

2.2.2.2.1. Réduction du ferricyanure de potassium (Varshney et al., 2012)

Principe :

Il est basé sur la réduction du ferricyanure de potassium K₃ [Fe(CN)₆] en ferrocyanure de potassium K₄ [Fe(CN)₆] par un antioxydant suivant l'équation ci-dessous. Cette réduction se traduit par la disparition de la coloration jaune de la solution qui passe au vert en présence du chlorure ferrique (FeCl₃). L'absorbance de la solution est lue à 700 nm.



Mode opératoire

Dans chaque tube à essai ont été ajoutés successivement 50 µl d'une solution soit d'extrait, soit de la vitamine C ou de DMSO (contrôle négatif), 1100 µl de tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6), 1 ml d'une solution de ferricyanure de potassium 0,25%. Le mélange a été incubé à 50°C pendant 20 minutes. Après refroidissement dans un courant d'eau, 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) 10% a été additionné. Le mélange a ensuite été centrifugé (3000 trs/min, 10 min, 4°C) et 1 ml du surnageant a été prélevé, additionné à 200 µl de FeCl₃ (0,02%) et l'absorbance de la solution verte obtenue a été lue après 10 minutes à 700 nm. La contribution de la coloration due à l'extrait de plante a été soustraite en ajoutant 200 µl du tampon phosphate à la place du FeCl₃ dans les tubes servant de blanc.

2.2.2.2.2. Réduction du molybdate (Blažeković et al., 2010)

Principe :

En milieu acide, l'anion phosphore du phosphate de sodium réagit avec le molybdate d'ammonium pour former l'acide phosphomolybdique. Ce dernier est réduit par un

antioxydant en bleu de molybdène. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en ions phosphores présents dans le milieu. L'absorbance est lue à 695 nm.

Mode opératoire :

Dans chaque tube à essai ont été ajoutés successivement 50 µl d'une solution d'extrait ou de la vitamine C, puis 1000 µl de la solution d'acide sulfurique (0,6 M), 1050 µl de la solution de phosphate de sodium (28 mM) et 1050 µl de la solution de molybdate d'ammonium (4 mM). Le mélange a ensuite été incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement à température ambiante, les absorbances ont été lues à 695 nm. La capacité antioxydante a été estimée en mg équivalent acide ascorbique par g d'extrait (mg EAA/g d'extrait) en utilisant la courbe d'étalonnage de la vitamine C.

2.2.2.3. Activité d'inhibition de la peroxydation lipidique

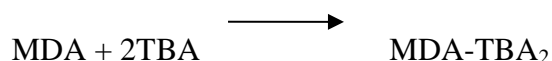
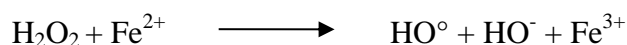
2.2.2.3.1. Préparation de l'homogénat

Après sacrifice par dislocation cervicale et dissection d'un rat, le foie a été rapidement isolé et bien rincé dans l'eau physiologique (NaCl 0,9%) puis essoré à l'aide d'un papier filtre. Il a été ensuite pesé, découpé en petits morceaux et homogénéisé pour enfin aboutir à un homogénat à 10 % (p/v) avec une solution de KCl 1,15% dans la glace, ceci à l'aide d'un homogénéisateur de Potter. Les mélanges obtenus ont été centrifugés (3000 trs/min, 10 min, 4°C) afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été récupéré dans les tubes en polypropylène de 15 ml et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

2.2.2.3.2. Test d'inhibition de la peroxydation lipidique dans l'homogénat de foie de rats (Su et al., 2009)

Principe :

En présence du FeCl₂ et du H₂O₂, les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont oxydés en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) dont le MDA. Ce dernier, en milieu acide et à chaud réagit avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner un complexe coloré rose qui absorbe à 532 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de produit formé dans le milieu.



Mode opératoire

Dans chaque tube à essai ont été ajoutés successivement 50 µl d'une solution soit d'extrait, soit de la vitamine C (témoin positif), 1ml d'homogénat 10%, 50 µl de FeCl₂ (0,5 mM) et 50µl H₂O₂ (0,5 mM). Le mélange a ensuite été incubé à 37°C pendant 60 minutes puis, 1 ml d'acide trichloroacétique (15%) et 1 ml d'acide thiobarbiturique (0,67%) ont été ajoutés. Pour éliminer les produits de la peroxydation existant dans l'homogénat avant incubation, 1 ml d'homogénat a été ajouté dans un tube après ajout de TCA et TBA. Les tubes ont été incubés à 100°C pendant 15 minutes, puis refroidis dans un courant d'eau et centrifugés (3000 trs/min, 5 min, 4°C). Dans les tubes témoins négatifs, l'extrait a été remplacée par de l'eau distillée et l'absorbance du surnageant a été lue à 532nm. Les différents pourcentages d'inhibition ont été calculés selon la formule suivante:

$$\%I = \frac{DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{essai}}}{DO_{\text{témoin}}} \times 100$$

2.2.3. Evaluation *in vitro* des propriétés antihépatotoxiques des extraits aqueux de *D. adscendens*

2.2.3.1. Isolement des hépatocytes primaires et test de viabilité

2.2.3.1.1. Isolement des hépatocytes de rat

Les rats ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de la kétamine à la dose de 87,5 mg/kg de poids corporel, puis les hépatocytes ont été isolés *in situ* par perfusion hépatique avec de la collagénase selon le protocole décrit par Gandin et al. (2009). Les hépatocytes ont été lavés et mis en suspension dans le milieu DMEM supplémenté en L-glutamine (2 mM), NaHCO₃ (0,5 g/L), pénicilline (100 UI / mL), streptomycine (100 µg / mL), fungizone (5 µg / mL) et 10% de sérum fœtal bovin.

2.2.3.1.2. Test de viabilité cellulaire au Bleu Trypan (Strober, 2001)

Principe

En présence du Bleu Trypan, les cellules vivantes déclenchent un mécanisme d'exclusion du colorant qui empêche son internalisation. Elles apparaîtront brillantes au microscope optique contrairement aux cellules mortes qui seront colorées en bleue.

Mode opératoire

Une solution de Bleu Trypan à 0,4% préparée dans le tampon phosphate salin (PBS) a été utilisée pour ce test. Dans un tube eppendorf de 1,5 mL, 100 µl de la suspension cellulaire fraîchement préparée ont été introduits, puis 400 µl de la solution de Bleu Trypan 0,4%. L'ensemble a été mélangé 3 à 4 fois à l'aide d'une micropipette, puis 10 µl de la suspension obtenue ont été prélevés et déposés dans la chambre de *Neubauer*

(Figure 17). La préparation a été ensuite observée au microscope optique et les cellules vivantes et mortes ont été comptées à l'aide d'un hémocytomètre.

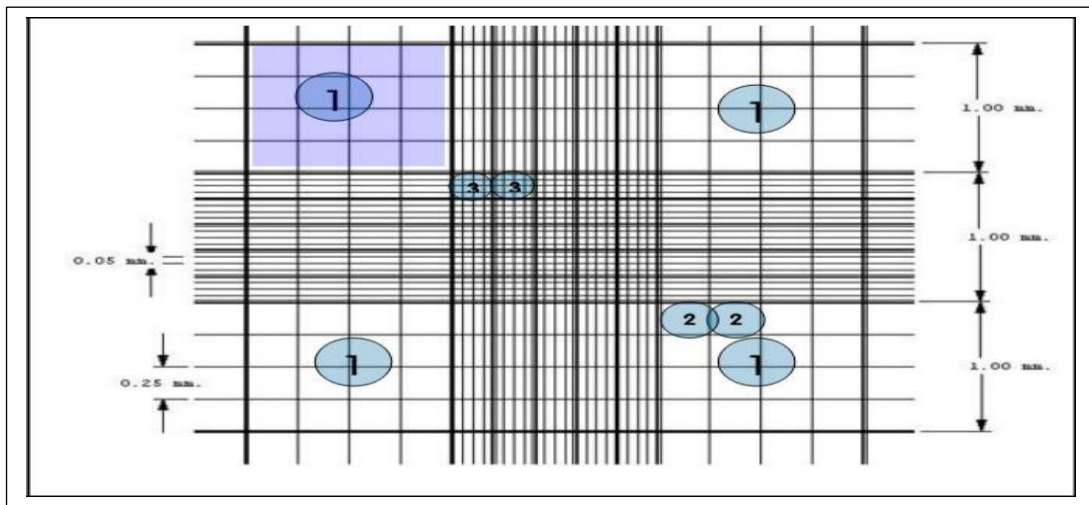


Figure 17: Chambre de Neubauer

Les cellules ont été comptées dans les quatre carrés qui ont chacun pour superficie $S = 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ soit 1mm^2 et pour volume: $V = 1\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm} = 0,1\text{mm}^3 = 1 \times 10^{-4}\text{mL}$.

Le calcul de la concentration de la suspension cellulaire de départ a été effectué en utilisant la formule suivante:

$$\frac{\text{Cellules}}{\text{mL}} = \frac{\text{Nombre total de cellules dans les 4 carrés} \times 100 \times fd \times 10000}{\text{Nombre de carrés comptés}(4)}$$

Avec: fd = facteur de dilution = $500/100 = 5$

Le pourcentage de viabilité a été ensuite déterminé par la formule ci-dessous.

$$\% \text{de viabilité cellulaire} = \frac{\text{Nombre de cellules brillantes} \times 100}{\text{Nombre total de cellules}}$$

2.2.3.2. Effet du temps sur la viabilité des cellules

Cet effet s'est fait en utilisant le test au MTT qui est une détection quantitative et sensible pour évaluer la viabilité et la prolifération des cellules en cultures.

Les cellules (200 000 cellules/ml) ont été réparties dans des tubes Eppendorf 1,5 ml stériles et incubées dans le milieu DMEM contenant le sérum de veau fœtal (10%), de pénicilline / streptomycine (1%) et de fungizone (5µg/ml). L'incubation des hépatocytes s'est faite en atmosphère (air : CO₂ 95/5 v/v) dans un incubateur de série BPN-80CH. Toutes les 2 heures pendant 12h, une série de tubes a été retirée de l'incubateur et centrifugée (2000trs/min, 4°C, 5min). Le surnageant a été collecté pour le dosage de l'ALAT tandis que le culot récupéré, lavé avec du PBS puis soumis au test de viabilité au MTT (Kasugai et al., 1991).

2.2.3.3. Effets des extraits de *D. adscendens* sur la viabilité des hépatocytes

Quatre cent cinquante microlitres de suspension cellulaire (200 000 cellules/ml) ont été introduits dans chaque tube, puis, traités par 50 µl d'extraits aux concentrations finales de 1, 10, 100 et 1000 µg/ml. Les tubes témoins ont été incubés avec 50 µl de milieu DMEM. Les tubes ont été ensuite homogénéisés et incubés à 37°C en atmosphère CO₂ comme précédemment décrit pendant 6h, temps d'incubation retenu après l'expérience précédente. Après incubation, les tubes ont été centrifugés (2000 trs/min, 5min, 4°C). Le surnageant a été collecté pour le dosage de l'ALAT et le culot lavé avec 100µl de PBS pH 7,4 ; puis soumis au test de viabilité au MTT. Les pourcentages de viabilité ont été calculés par rapport au témoin.

2.2.3.4. Recherche de la dose cytotoxique médiane du CCl₄ à utiliser

Plusieurs concentrations de tétrachlorure de carbone (100 ; 200 ; 400 ; 600 ; 800 ; 1000 ; 1200 ; 1500 et 2000 mM) ont été préparées par dilution successive dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). La suspension cellulaire a été répartie dans les tubes Eppendorf à raison de 990µl, puis un volume de 10µl de toxique a ensuite été ajouté dans chaque tube pour des concentrations finales de CCl₄ de 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 ; 12 ; 15 et 20 mM. Dans les tubes Eppendorf témoins, 10µl de DMSO ont été ajoutés.

Le contenu des tubes a été mélangé et incubé à 37°C dans l'incubateur à CO₂ 5% pendant 6 heures. A la fin de l'incubation, les tubes ont été centrifugés (2000trs/min, 5min, 4°C), le surnageant collecté pour le dosage de l'ALAT, le culot lavé avec 500µl de PBS (0,1M; pH 7,4) puis soumis au test de viabilité. Les pourcentages de viabilité ont été calculés par rapport au témoin DMSO. La concentration cytotoxique médiane (CL50).

2.2.3.5. Evaluation de l'effet des extraits de *D. adscendens* contre l'hépatotoxicité induite par le carbone tétrachlorure (CCl₄)

Les propriétés antihépatotoxiques des extraits de *D. adscendens* ont été étudiées sur le modèle d'hépatite toxique induit au CCl₄. Dans chacun des cas, ces propriétés ont été évaluées de façon préventive et curative.

- **En traitement hépatoprotecteur**, les hépatocytes ont été pré-incubés pendant 30 minutes en présence des extraits de plantes, puis le CCl₄ a été ajouté.
- **En traitement hépatocurateur**, les hépatocytes ont été incubés en présence du CCl₄ pendant 30 minutes puis les extraits de plante ajoutés.

2.2.3.5.1. Etude dose-réponse des activités hépatoprotecteurs et hépatocurateurs des extraits de *D. adscendens*

2.2.3.5.1.1. Tests hépatoprotecteurs

Les hépatocytes ont été ensemencés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml à raison de 200 000 cellules/ml. Ces tubes ont été répartis en trois lots ayant chacun des essais en triple comme suit :

- Traitement A ou lot témoin négatif : les cellules ont été traitées avec 10 µl de milieu dans le DMSO ;
- Traitement B ou lot essai : les cellules ont été traitées par ajout de 10µl d'extrait pour une concentration d'incubation de 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 µg/ml dissouts dans de le milieu.
- Traitement C ou lot témoin positif ou control: les hépatocytes ont été traités avec la silymarine, dans les mêmes conditions de volume et de concentration que les extraits.

Les tubes ont été ensuite mélangés et incubés pendant 30 min à 37 °C en atmosphère 5% CO₂. Par la suite, 10 µl de CCl₄ à la concentration finale de 5 mM ont été ajoutés dans les lots B et C. Le témoin négatif (lot A) quant à lui a reçu 10 µl de DMSO utilisé pour la dissolution de l'agent toxique. L'ensemble a été mélangé, puis ré-incubés à 37°C sous atmosphère 5% CO₂ pendant 6 heures. A la fin de l'incubation, les tubes ont été mélangés et 500 µl de suspension cellulaire ont été prélevés pour évaluer le taux de malondialdéhyde. Les 500 µl restants ont été centrifugés (2000 trs/min, 5 min, 4°C). Le surnageant a été recueilli pour le dosage de l'ALAT et le culot cellulaire lavé dans du PBS et utilisé pour le test de viabilité au MTT.

2.2.3.5.1.2. Tests hépatocurateurs

Les traitements ont été effectués comme précédemment, à la différence que dans les tests hépatocurateurs, le toxique (CCl₄) a été ajouté 30 minutes avant les extraits de plantes.

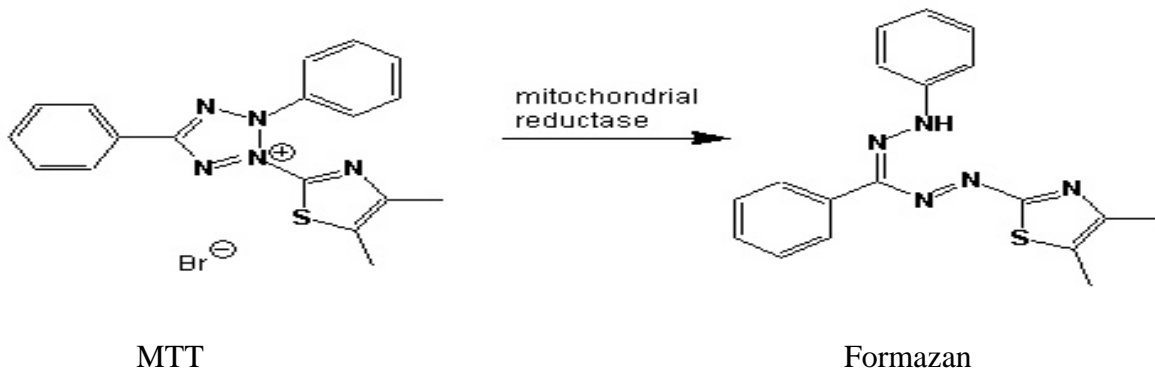
2.2.3.6. Analyses biochimiques

Les analyses biochimiques ont été réalisées sur les suspensions cellulaires, les surnageant et culot cellulaires post centrifugation : il s'agit du test de viabilité au MTT-formazan sur culot cellulaire, le dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT) du surnageant et celui du malonedialdéhyde (MDA) des suspensions cellulaires.

2.2.3.6.1. Test de viabilité des hépatocytes au MTT (Kasugai et al., 1991)

Principe :

Le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ou MTT est un réactif utilisé pour évaluer l'activité de l'enzyme mitochondriale: la succinate déshydrogénase. Cette enzyme est capable de réduire le sel de tétrazolium de couleur jaune en un produit formazan bleu violet qui absorbe avec un maximum compris entre 550 et 570nm. Seules les cellules avec une mitochondrie viable (fonctionnelle) peuvent réduire le MTT.



Mode opératoire

Le culot cellulaire issu des différentes incubations, est repris dans 500 µl d'une solution de MTT (1mg/ml dans le PBS). Le mélange est incubé à 37°C pendant 90 min puis centrifugé à 2000 tours/min, 4°C pendant 5min), le surnageant éliminé et les tubes égouttés. Un ml de DMSO est ajouté dans chaque tube pour dissoudre les cristaux de formazan formés et la densité optique (DO) de la solution violette obtenue lue à 560 nm contre la solution de DMSO. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été ensuite calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{\text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance témoin}} \times 100$$

Echantillon : cellules traitées par les différents extraits

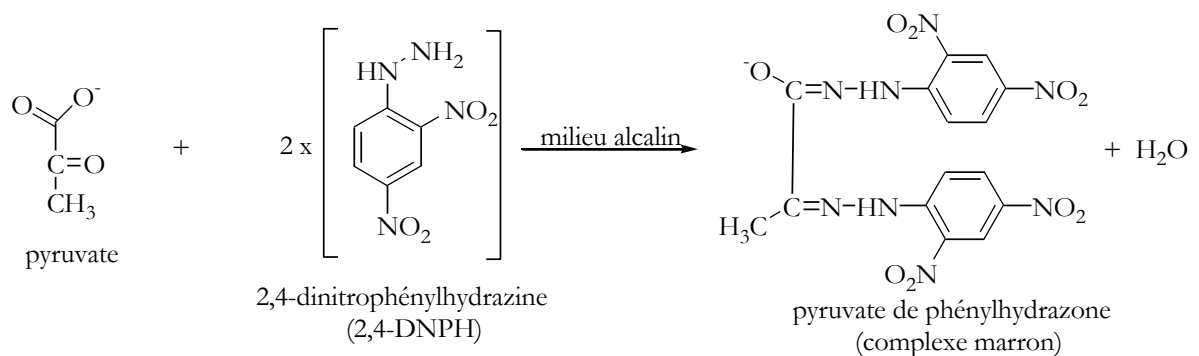
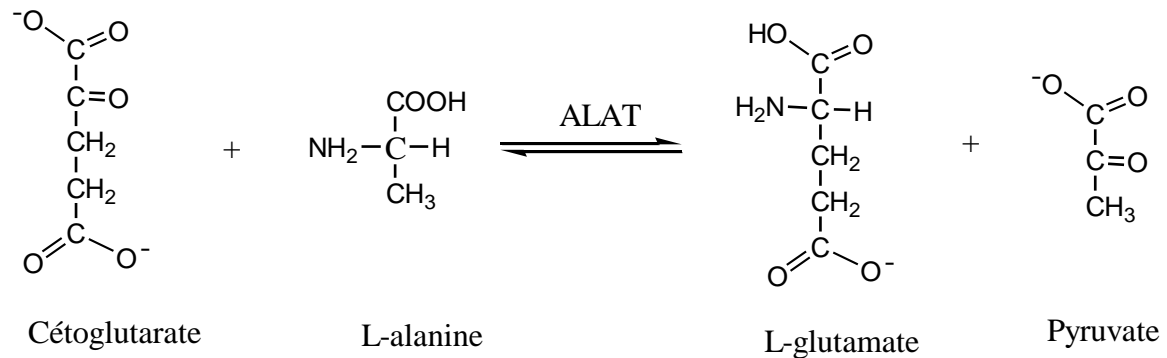
Témoin : cellules issues des incubations d'eau distillée/DMSO 50%

2.2.3.6.2. Détermination de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT) (Reitman-Frankel, 1957)

Principe

L'ALAT (EC 2.6.1.2) catalyse le transfert du groupement aminé de l'alanine sur l' α -cétoglutarate pour former le pyruvate et le glutamate. Le pyruvate ainsi formé, réagit avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) pour donner un complexe hydrazone de couleur marron en présence de la soude NaOH), qui absorbe avec un maximum d'intensité à 505 nm.

L'intensité de la coloration développée est proportionnelle à l'activité de l'enzyme présente dans le milieu.



Dans deux tubes à essai marqués blanc et test, ont été introduit 360 μL de substrat ALAT (Alanine 0,2M, α -cétoglutarate 2mM dans le tampon phosphate 0,1M, pH 7,4) qui ont été pré-incubés pendant 5 min à 37°C au bain marie. Ensuite, 40 μL de surnageant et 40 μL de milieu de culture ont été ajoutés respectivement dans les tubes test et blanc. Les tubes ont été mélangés, puis incubé pendant 30 min à 37°C au bain marie. Deux cent microlitres de 2,4-DNPH ont été ajoutés dans tous les tubes, qui ont été mélangés et incubés à température ambiante pendant 20 min, puis 2 mL de NaOH 0,4 M y ont été ajoutés pour développer la coloration. Les tubes ont une fois de plus été mélangés et incubés à température ambiante pendant 30 min. Enfin, l'absorbance de la solution marronne formée a été lue contre le blanc à 505 nm au spectrophotomètre (SHIMADZU-UV-120-01). Les activités de l'ALAT dans le milieu ont été calculées à partir de la droite d'étalonnage (Figure 18) obtenue à partir de la solution de pyruvate de sodium à 0,22g/l.

Tableau IV: Etalonnage du pyruvate de sodium

Solutions	Tubes				
	1	2	3	4	5
Pyruvate de sodium (0,22mg/ml) (µl)	0	20	40	60	80
Substrat ALAT (µl)	400	360	320	280	240
Solution de 2,4-DNPH (µl)	200	200	200	200	200
Homogénéiser et attendre 20 minutes à la température ambiante					
NaOH 0,4N (µl)	2000	2000	2000	2000	2000
Mélanger et attendre 30 minutes à la température ambiante et lire la densité optique (DO) contre le blanc (tube 1) à 505 nm					
Activité de l'ALAT (U/L)	0	23	50	83	125
DO à 505 nm	0,000	0,090	0,160	0,214	0,260

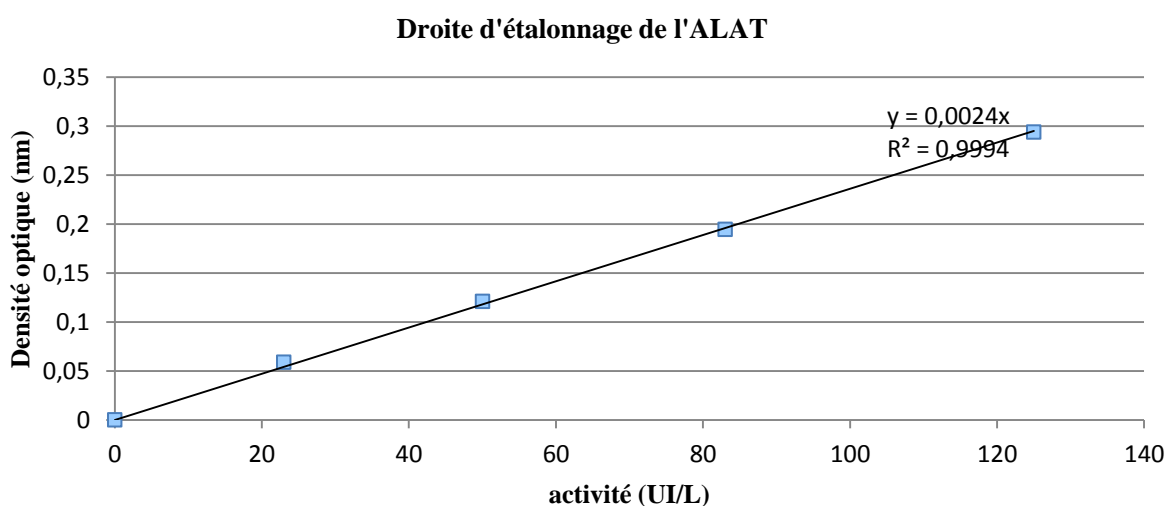
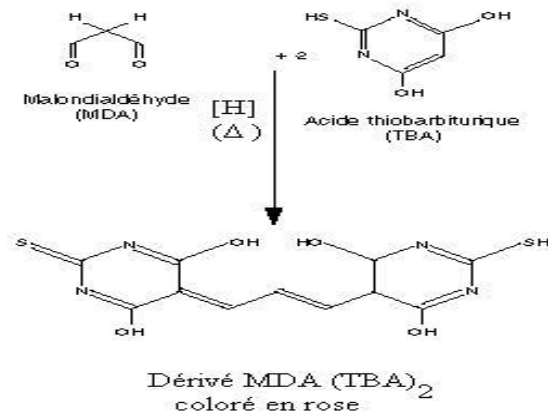


Figure 18: Droite d'étalonnage du pyruvate de sodium

2.2.3.6.3. Détermination du taux de dialdéhyde malonique (MDA) (Wilbur et al., 1949)

Principe :

En milieu acide et à chaud (pH 2 à 3, 100°C), une molécule de MDA se condense avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose qui a un maximum d'absorption à 532 nm. L'intensité de la coloration étant proportionnelle à la quantité de MDA formée.



Mode opératoire

Dans tous les tubes essais et blanc, nous avons introduit 500µl de suspensions cellulaires et 100µl de solution de Triton X-100 à 0,2% dans le PBS pour lyser les membranes. Puis dans chacun de ces tubes, 125µl d'acide trichloroacétique (TCA 20% P/v) et 500µl d'acide thiobarbiturique (TBA 0,67% P/v) ont été ajoutés. Le mélange obtenu a été homogénéisé, bouché à l'aide des billes de verre et chauffé dans de l'eau bouillante pendant 20min, puis refroidi dans la glace pendant 5min. La suspension a été ensuite centrifugée (3000trs/min, 15min, 4°C), puis le surnageant collecté et la densité optique lue à 532nm contre le blanc. Les concentrations en MDA ont été calculées par la formule suivante.

$$[MDA](\mu M/500000 \text{ hépatocytes}) = \frac{DO \times V_{ts} \times 10^6}{\epsilon_{MDA} \times V_{sp} \times l}$$

Avec:

- DO = densité optique
- V_{ts} = volume total du surnageant dans les tubes (µl)
- ϵ_{MDA} = coefficient d'extinction molaire du MDA = $1,56 \times 10^5 M^{-1} \cdot cm^{-1}$
- V_{sp} = volume de surnageant prélevé pour le dosage (µl)
- l = trajet optique (1cm)

2.2.4. Evaluation *in vitro* des extraits de *D. adscendens* sur les réplicons subgénomiques de génotype 1b du Virus de l'hépatite C (VHC)

2.2.4.1. Traitement

Les cellules réplicons LucUbiNeo-ET (Heidelberg, Allemagne) ont étéensemencées dans les plaques de 24 puits à raison de 1×10^5 cellules/mL/puits dans le DMEM complet. Après avoir été incubées à 37°C, pendant 24h en atmosphère humide, 5% CO₂, les cellules ont été mises en présence des extraits aqueux de *Desmodium adscendens* à 250, 500 et 1000 µg/mL pendant 24h et 72h ou en présence du Telaprevir (Janssen-Cilag International, Beerse, Belgique), à 1µM pendant 24h. Pour toutes les expériences, les contrôles ont été incubés à la

même concentration de DMSO utilisée dans les groupes tests. Aucun effet du DMSO sur la viabilité cellulaire et la réplication du VHC n'a été observé jusqu'à une concentration de 1%.

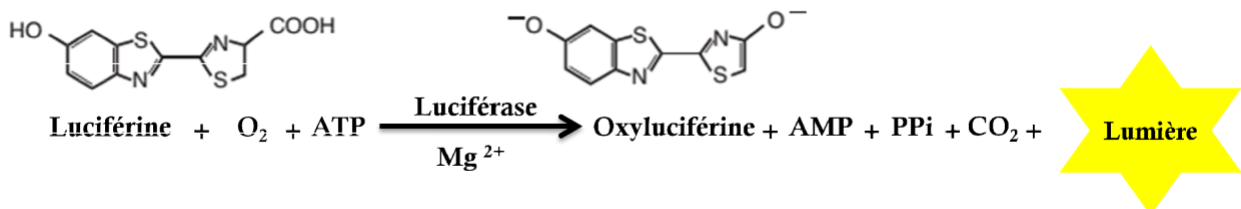
2.2.4.2. Test du gène rapporteur de la luciférase du VHC

Les rapporteurs génétiques sont des outils importants en biologie cellulaire pour l'étude de l'expression des gènes et des événements cellulaires associés tels que la transduction du signal intracellulaire, le repliement des protéines, les interactions protéines-protéines. La luciférase de la luciole est largement utilisée comme rapporteur pour cause de rapidité et de sensibilité de son dosage. Du fait que la protéine une fois exprimée ne nécessite aucune modification post-traductionnelle, l'activité rapporteuse est immédiatement disponible.

Le kit de dosage Promega (Mannheim, Allemagne), utilisé ici contient la luciférase de la luciole isolée de *Photinus pyralis*. Les cellules répliquons LucUbiNeo-ET ont été transfectées avec un plasmide contenant les gènes non-structuraux du VHC fusionnés avec le gène de la luciférase sous le contrôle de l'IRES du VHC. L'expression de ce rapporteur est directement corrélée à la réplication virale.

Principe

Les luciférases sont une classe d'enzymes oxydatives, qui permettent aux organismes vivants d'être bioluminescents, c'est-à-dire d'émettre de la lumière. Elles catalysent l'oxydation de la luciférine, en présence d'ATP et d'O₂ en oxyluciférine, AMP, pyrophosphate (PPi) et CO₂ avec production de lumière, selon l'équation ci-dessous:



Cette lumière ou bioluminescence peut être détectée et quantifiée à l'aide d'un luminomètre. L'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la quantité de luciférase présente dans l'échantillon et directement corrélée à la réplication virale. Plus cette intensité est faible, plus il y a inhibition de la réplication du VHC (**de Wet et al., 1987**).

Mode opératoire :

La quantification de la réplication virale dans les cellules LucUbiNeo-ET a été réalisée en utilisant un kit de dosage de Proméga.

Les cellules LucUbiNeo-ET ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 10⁵ cellules/puits, puis incubées pendant 24h en atmosphère humide 5% CO₂. Le surnageant de culture a été ensuite débarrassé et les cellules ont été incubées en présence de différentes

concentrations d'extraits de *D. adscendens* (250, 500, 1000 µg/mL), ou du Telaprevir (1 µM) (Janssen-Cilag Pharma GmbH, Vienne, Autriche), pendant 24 h à 37°C sous atmosphère humide 5%CO₂. Après incubation, les surnageants ont été à nouveau éliminés et les cellules lavées une fois avec 500 µl de PBS. Les cellules ont été ensuite lysées avec 120 µl du réactif de lyse cellulaire (CCLR) dilué 5 fois. Après une première incubation de 10 minutes à 37°C, les lysats ont été transférés dans des micro-tubes de 1,5 mL puis centrifugés pendant 1 min à 14 000 trs/min à 4°C. Après centrifugation, les tubes ont été transférés sur la glace et les surnageants progressivement collectés dans de nouveaux tubes eppendorfs sur glace. Pour la détection de la bioluminescence, cette opération nécessite le transfert de 70 µl de chaque échantillon dans une plaque blanche de 96-puits et l'ajout rapide de 50 µl du réactif de dosage de la luciférase (LAR). La bioluminescence est instantanément mesurée au luminomètre (Tecan® infinite M200). Pour l'analyse, les valeurs ont été normalisées au contenu en protéine de chaque échantillon pour obtenir l'activité relative de la luciférase exprimée en RLU/µg de protéine. Cette expression rend compte du % de répllication calculé à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ Réplication} = (\text{RLU du puits test} \times 100) / (\text{RLU du puits DMSO})$$

2.2.4.3. Détermination du taux de protéines dans les lysats cellulaires (Bradford, 1976)

Principe :

La méthode de Bradford est un test colorimétrique qui permet de quantifier les protéines dans un échantillon. Le bleu de Coomassie G-250, en milieu acide, se fixe aux protéines et prend une couleur bleue. Cette fixation entraîne un déplacement du maximum d'absorption de 465 à 595 nm due à la réaction du Bleu brillant G-250 avec les chaînes latérales non-polaires et cationiques des protéines. L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon

Mode opératoire

Le protocole de dosage Bio-Rad (Laboratoires Biorad, Munich, Allemagne) a été utilisé pour la détermination de la concentration en protéines. Le réactif a été dilué au 1/5 avec de l'eau distillée et 198 µl de la solution de Bradford obtenue ont été mélangés avec 2 µl de l'échantillon de lysat ou de tampon de lyse. L'absorbance (Abs.) a été mesurée à 595 nm après 10 min d'incubation à température ambiante en utilisant un spectrophotomètre de marque Tecan® infinite M200. La concentration en protéine a été calculée avec la formule:

$$\text{Protéine } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{(\text{Abs Echantillon} - \text{Abs blanc}) \times 20}{\text{Profondeur du puits (0,59cm)} \times \text{Volume échantillon } (\mu\text{L})}$$

2.2.5. Évaluation de l'activité antivirale des extraits de *D. adscendens* sur le cycle infectieux du VHC.

2.2.5.1. Culture des cellules Huh7 et ensemencement en plaque de criblage à haut débit (HCS) de 96 puits

Les cellules Huh-7 ont été mises en culture dans le milieu DMEM supplémenté avec 10% du sérum de veau foetal inactivé. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de pétri en plastique de 10 cm de diamètre à raison de 3×10^5 à 6×10^5 cellules/boîte sous atmosphère humide 5%CO₂ jusqu'à confluence totale. Ensuite, elles ont été passées dans de nouvelles boîtes de pétri pour de nouvelles cultures. Pour réaliser ce passage, les cellules ont d'abord été lavées 1 fois avec 2 mL de trypsine-EDTA 0.25% (Gibco Life Technologies) pour débarrasser les cellules mortes puis elles ont été incubées en présence de cette solution pendant 5 min à 37°C, à l'incubateur 5%CO₂, pour faciliter leur détachement. Après avoir décollé les cellules, 8 mL de DMEM complet (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Allemagne) ont été ajoutés et les cellules collectées plusieurs fois à l'aide d'une pipette. Une fraction de la suspension cellulaire obtenue a été ensuite diluée 10 fois pour obtenir une suspension, d'environ 6×10^4 cellules/mL, qui a été ensuite utilisée pour les expériences. Cent microlitres (100 µL) de cette suspension cellulaire diluée ont été ajoutés par puits dans une plaque de 96-puits à fond transparent et les cellules incubées toute la nuit en atmosphère humide 5%CO₂ pour favoriser leur attachement.

2.2.5.2. Préparation de la suspension virale

La suspension virale a été préparée en diluant 10 fois la solution stock de HCVcc de souche JFH1-CSN6-A4 (génotype 2a, gracieusement offertes par T.Wakita) dans le milieu DMEM complet de manière à obtenir une concentration de 6×10^5 unités infectieuses (FFU)/mL.

2.2.5.3. Tests antiviraux :

2.2.5.3.1. Effet sur le cycle viral complet

Pour évaluer le potentiel antiviral d'extraits de DA sur le modèle infectieux HCVcc, nous avons procédé à une série de criblage afin d'évaluer l'effet des extraits de DA sur le cycle viral complet.

Les cellules Huh-7 ont été ensemencées dans les plaques HCS de 96 puits à raison de 6000 cellules/puits et incubées à 37°C pendant 24h, dans le milieu DMEM complet, sous atmosphère humide 5% CO₂. Après ce temps d'incubation, le surnageant de culture a été aspiré et les traitements effectués ainsi qu'il suit:

Groupe I (Témoin négatif) : Les cellules Huh7 ont été incubées pendant 2h en présence de 100 µl de l'inoculum HCVcc contenant du DMSO (concentration finale < 1%).

Groupe II (Témoin positif) : Les cellules Huh-7 ont été inoculées simultanément avec du HCVcc et des antiviraux de référence: le Bocéprévir (0,5 µM) ou l'EGCG (50 µM). Le Bocéprévir fourni par Philippe Halfon (Hôpital Européen, Laboratoire Alphabio, Marseille, France) est une molécule approuvée dans le traitement de l'hépatite C qui inhibe la protéase virale NS3/4A du VHC et donc l'étape de réplication. L'EGCG en provenance de Calbiochem (*Merck Chemicals*, Darmstadt, Allemagne) est un inhibiteur d'entrée du VHC et plus spécifiquement de l'attachement viral.

Groupe III (Test des extraits de DA) : Les cellules Huh-7 ont été incubées pendant 2h simultanément en présence du HCVcc et de l'extrait de DA à la concentration finale de 25 µg/mL.

A l'issue de ces 2h d'incubation, durée correspondant au temps d'infection, le surnageant de culture a été remplacé par du milieu DMEM contenant uniquement l'extrait de plante (DA)/antiviraux de référence aux mêmes concentrations que précédemment. Les cellules ont été ensuite incubées pendant 28h. Soit une durée totale d'incubation de 30h (2h+28h) représentant le cycle viral complet, sans qu'il y ait réinfection des cellules par des virions sécrétés dans le milieu. Dans le groupe I ou témoin négatif, du milieu contenant du DMSO<1% a été ajouté. La figure 19 ci-dessous présente un schéma simplifié de cette procédure de criblage.

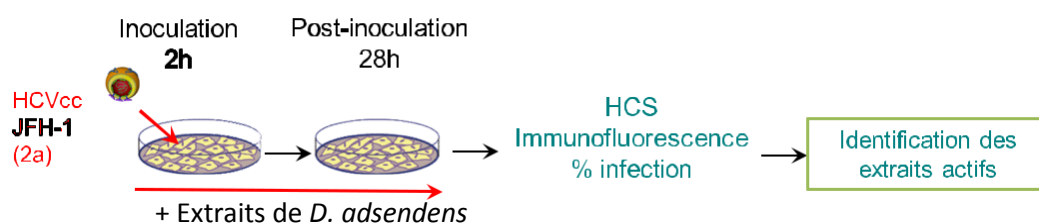


Figure 19: Schéma simplifié du criblage sur le système HCVcc

2.2.5.3.2. Quantification de l'infection par immunofluorescence indirecte

Principe

L'immunofluorescence indirecte est une technique d'immuno-marquage qui consiste à détecter un antigène viral grâce à un anticorps monoclonal spécifique de cet antigène, puis à révéler cette reconnaissance par une antiglobuline (anticorps secondaire) marquée qui se fixe à l'anticorps monoclonal. Cette antiglobuline peut être marquée par un fluorophore comme la

fluoroscéine ou le fluorochrome CY3. Une lecture en microscopie à fluorescence permet de visualiser les cellules fluorescentes et de préciser la localisation subcellulaire de l'antigène viral.

La technique utilisée ici nous permet de visualiser par fluorescence les cellules infectées par les particules virales HCVcc et de quantifier le taux d'infection. Elle repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal de souris qui reconnaît spécifiquement l'épitope A4 de la glycoprotéine E1 de l'enveloppe virale du VHC dans les cellules infectées: C'est l'anticorps primaire. Cet anticorps est lui-même reconnu par un anticorps polyclonal de chèvre anti-souris, couplé au fluorochrome CY3. Ainsi, les cellules infectées fluoresceront en jaune lorsqu'elles sont observées sous lumière UV. Parallèlement à ce marquage, les cellules sont également marquées au diamidino-2-phenylindole (DAPI) qui se fixe aux noyaux et les fluoresce en bleu. Ce marquage au DAPI permet de quantifier le nombre total de cellules présentes dans les puits. Par ailleurs, il nous donne une indication sur la toxicité des composés. Si on observe une baisse du nombre de cellules infectées et aucune baisse du nombre total de cellules, on conclura à un effet inhibiteur de la substance testée sur le VHC (Rouillé et al., 2006).

Mode opératoire

Les cellules Huh-7 préalablement fixées à -20°C dans du méthanol, ont été décongelées pendant quelques minutes à température ambiante puis le méthanol a été évacué. Cinquante µl du sérum de chèvre 1% ont été ensuite ajoutés afin de saturer chaque puits de la plaque et éviter les fixations non spécifiques, et les cellules incubées pendant 10 min à température ambiante. Après ce temps d'incubation, 50 µl d'anticorps monoclonal A4 (anti-E1) (Produite *in vitro* par l'équipe de J. Dubuisson, Lille, France) dilué au 1/500^{ème} dans du sérum de chèvre 1% ont été ajoutés et les cellules incubées à nouveau à température ambiante pendant 30 min. Après ce temps d'incubation, les cellules ont été lavées 3 fois par ajout de 100 µl de PBS pendant 5 min. Puis 50 µl du mélange (25µl de DAPI (1µg/mL) de Molecular Probes (Life Technologies) et 25 µl d'anticorps secondaire de chèvre anti-souris marqué au Cy3 (CY3GAM) de Jackson Immunoresearch (West grove, PA, USA) dilué au 1/500^{ème} dans du sérum de chèvre 1%) ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées à l'obscurité pendant 25 à 30 min suivies de 3 lavages au PBS. Les cellules au 3^{ème} lavage ont été laissées dans le tampon PBS et acheminées à la plateforme d'imagerie du centre d'infection et d'immunité de Lille où la fluorescence a été quantifiée. Les images ont été prises dans chaque puits à l'aide d'un microscope à fluorescence automatisée IN Cell Analyser 6000 (GE Healthcare Life

Sciences), à l'objectif x 20 avec des paramètres d'exposition 405/450 nm et 561/610 nm. Six images ont été enregistrées par puits. Chaque image a été ensuite traitée à l'aide du logiciel d'analyse d'image Columbus (Perkin Elmer). Les quantités de cellules par puits et les taux d'infection ont été calculés afin d'obtenir au maximum 40% de cellules infectées par puits et de permettre la quantification automatisée. Les données ont été ensuite normalisées à 100% d'infection par rapport au témoin négatif.

2.2.6. Evaluation *in vivo* de l'effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux de *D. adscendens* vis-à-vis de l'hépatite induite par le tétrachlorure de carbone et le paracétamol.

Afin d'évaluer *in vivo* et en fonction du temps l'effet de *D. adscendens* dans le processus de réparation hépatique, deux expérimentations ont été conduites chez des rats adultes pendant 5 jours en induisant l'hépatite chez ces animaux par un toxique environnemental dans un cas, le tétrachlorure de carbone et un médicament dans un autre cas, le paracétamol.

2.2.6.1. Protocoles expérimentaux

2.2.6.1.1. Cas du tétrachlorure de carbone (CCl₄)

Quarante huit rats mâles albinos adultes de souche *Wistar* pesant entre 170 et 240 g ont été répartis en 12 groupes de 4 rats chacun et acclimatés pendant 7 jours. Les groupes ont été numérotés de 1 à 12.

Le jour 0 (J0). Les rats des groupes 2 à 9 ont reçu par voie intrapéritonéale, du CCl₄ dissous dans l'huile de maïs (v/v) à la dose de 0,3 mL CCl₄/kg de poids corporel solubilisé dans l'huile de maïs à raison de 7mL/kg. Les rats du groupe 1 ont reçu de l'huile de maïs (HM), véhicule du CCl₄. Une heure de temps après la première administration, les rats ont reçu en plus par gavage de l'eau distillée (ED) pour ceux des groupes 1 à 4, du *D. adscendens* à la dose de 50 mg/kg (DES1) pour ceux des groupes 5 et 6, du *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg (DES2) pour ceux des groupes 7 et 8 et de la silymarine, composé hépatoprotecteur de référence, à la dose de 100 mg/kg (Si) pour ceux du groupe 9.

Les rats des groupes 10, 11 et 12 ont reçu par gavage DES2.

Les jours 1 à 3 (J1-3). Les rats des groupes 2 et 10 sont sacrifiés et les autres reçoivent quotidiennement de l'ED pour les rats des groupes 1, 3 et 4 ; DES1 pour ceux des groupes 5 et 6 ; DES2 pour ceux des groupes 7, 8, 11 et 12 et enfin Si pour ceux du groupe 9.

Le jour 4 (J4). Les rats des groupes 3, 5, 7 et 11 sont sacrifiés et les autres reçoivent quotidiennement de l'ED pour les rats des groupes 1 et 4 ; DES1 pour ceux du groupe 6, DES2 pour ceux des groupe 8 et 12 et Si pour les animaux du groupe 9.

Le jour 5 (J5). Les rats des groupes 1, 4, 6, 8, 9 et 12 sont sacrifiés.

Pendant la phase d'acclimatation et durant l'expérimentation, les animaux ont été maintenus à un cycle lumière/obscurité (12/12 heures) à la température du laboratoire et ont reçu à volonté durant toute cette période de l'eau du robinet et de l'aliment. Douze heures avant le sacrifice, les rats sont laissés à jeun et seule l'eau du robinet leur est fournie.

2.2.6.1.2. Cas du paracétamol

Quarante huit rats mâles albinos adultes de souche *Wistar* pesant entre 170 et 240 g ont été répartis en 12 groupes de 4 rats chacun et acclimatés pendant 7 jours. Les groupes ont été numérotés de 1 à 12.

Le jour 0 (J0). Les rats des groupes 2 à 9 ont reçu par gavage du paracétamol à la dose de 500 mg/kg dissous dans le carboxyméthyl cellulose (CMC) 1%, et ceux du groupe 1 du CMC 1%, véhicule du paracétamol. Une heure de temps après la première administration, les rats ont reçu en plus par gavage de l'eau distillée (ED) pour ceux des groupes 1 à 4, du *D. adscendens* à la dose de 50 mg/kg (DES1) pour ceux des groupes 5 et 6, du *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg (DES2) pour ceux des groupes 7 et 8 et de la silymarine, composé hépatoprotecteur de référence, à la dose de 100 mg/kg (Si) pour ceux du groupe 9. Les rats des groupes 10, 11 et 12 ont reçu par gavage DES2.

Les jours 1 à 3 (J1-3). Les rats des groupes 2 et 10 sont sacrifiés et les autres reçoivent quotidiennement de l'ED pour les rats des groupes 1, 3 et 4 ; DES1 pour ceux des groupes 5 et 6 ; DES2 pour ceux des groupe 7, 8, 11 et 12 et enfin Si pour ceux du groupe 9.

Le jour 4 (J4). Les rats des groupes 3, 5, 7 et 11 sont sacrifiés et les autres reçoivent quotidiennement de l'ED pour les rats des groupes 1 et 4 ; DES1 pour ceux du groupe 6, DES2 pour ceux des groupe 8 et 12 et Si pour les animaux du groupe 9.

Le jour 5 (J5). Les rats des groupes 1, 4, 6, 8, 9 et 12 sont sacrifiés.

Pendant la phase d'acclimatation et durant l'expérimentation, les animaux ont été maintenus à un cycle lumière/obscurité (12/12 heures) à la température du laboratoire et ont reçu à volonté durant toute cette période de l'eau du robinet et de l'aliment. Douze heures avant le sacrifice, les rats sont laissés à jeun et seule l'eau du robinet leur est fournie.

2.2.6.2. Sacrifice des animaux

Les rats sont pesés, puis sacrifiés par décapitation. Le sang de chaque rat est recueilli dans les tubes à essai de verre secs ; leur foie est également prélevé, lavé dans un tampon Tris-HCl 50 mM, puis séché sur du papier filtre. Le lobe gauche de chaque foie a été excisé et conservé dans une solution de formol 10% pour l'immunohistochimie. Le reste est pesé et utilisé pour la préparation de l'homogénat 10%.

2.2.6.3. Préparation du sérum

Le sang collecté dans les différents tubes a été laissé au repos à température ambiante pendant trente minutes puis centrifugé à 3000 trs/min à 4°C pendant 15 min. Le surnageant obtenu, représentant le sérum, a été récupéré à l'aide d'une pipette pasteur, réparti en aliquotes qui sont conservés au congélateur à -40°C pour les analyses biochimiques (ALAT, ASAT, PAL, MDA).

2.2.6.4. Préparation de l'homogénat hépatique

Les foies prélevés après sacrifice des animaux ont été pesés et des homogénats à 10% ont été préparés. Les homogénats obtenus ont été centrifugés à 3500 trs / min pendant 25 minutes à 4 ° C après broyage dans un mortier sur un bac à glace. Le surnageant collecté a été conservé congelé à -20 ° C pour la détermination des paramètres biochimiques (GSH, SOD, CAT, MDA et protéines totales).

2.2.7. Dosage de quelques marqueurs biochimiques sériques de la fonction hépatique

2.2.7.1. Dosage colorimétrique des transaminases (ALAT et de ASAT) (Reitman-Frankel, 1957)

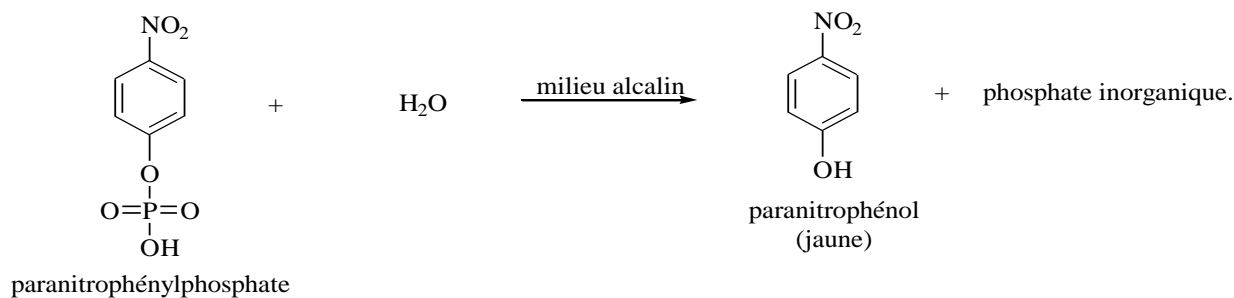
Le dosage des transaminases s'est fait selon la méthode décrite par Reitman et Frankel (1957) décrite précédemment.

2.2.7.2. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)

Principe

En milieu alcalin, la phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse du para nitrophénylphosphate (PNPP) en paranitrophénol (PNP) et phosphate inorganique. Le PNP formé, de couleur jaune, présente un maximum d'absorption à 405 nm.

L'augmentation de l'absorbance est directement proportionnelle à l'activité PAL de l'échantillon.



Mode opératoire

Dans une cuve spectrophotométrique de 2,5 mL, on introduit 1ml de réactif PAL constitué de PNPP 16mM, les ions magnésium 4mM, le mannitol 274mM, tous dissous dans un tampon pH 10,2. On ajoute 0,02 ml de sérum et on déclenche le chronomètre. Le contenu de la cuve est mélangé par inversion et l'absorbance à 405 nm est notée trente secondes après, puis deux minutes après la première lecture.

L'activité de la PAL est calculée à partir de la formule :

$$P_{AL} (U/l) = \frac{\Delta A \times V_T \times 1000}{2 \times \varepsilon \times V_E \times l}$$

$$\Delta A = A_i - A_o$$

A_i = Absorbance après 2 minutes 2 = Coefficient de conversion en 1 minute

A_o = Absorbance après 30 secondes l = trajet optique (1cm)

V_T = Volume total (1,02 ml) V_E = Volume de l'échantillon (0,02 ml)

1000 = conversion des unités par ml en unités par litre (U/l)

ε = Coefficient d'absorption millimolaire du para nitrophénol (18,45)

2.2.7.3. Dosage du malonedialdéhyde (MDA) (Wilbur et al., 1949)

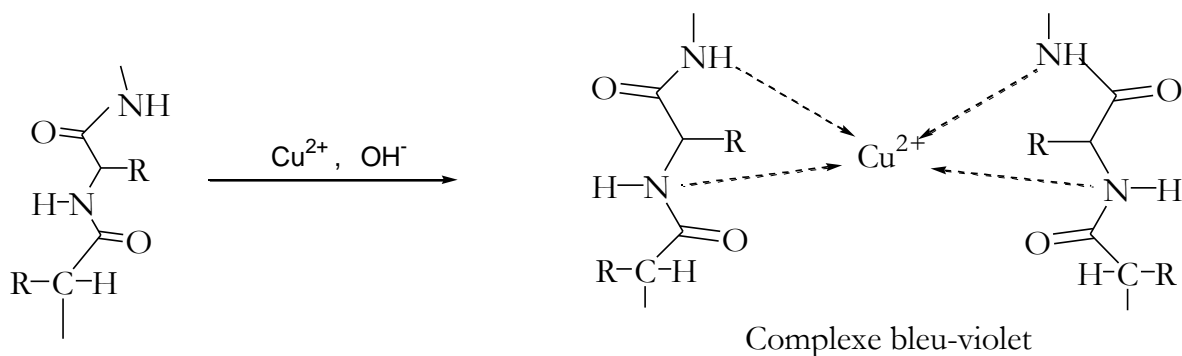
Le dosage du malonedialdéhyde s'est fait selon la méthode décrite **Wilbur et al. (1949)** décrite précédemment.

2.2.7.4. Dosage des protéines sériques et hépatiques (Gornall et al., 1949)

Principe

En milieu basique, le tartrate double de sodium et de potassium forme avec le sel cuivrique un complexe soluble. L'addition d'une protéine déplace le cuivre du complexe avec le tartrate pour former un nouveau complexe cupro-protéique, de couleur bleu-violette qui absorbe avec un maximum à 550 nm.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines de la solution à doser.



Mode opératoire

Dans un tube à essai, 0,03 ml de surnageant 10 000 x g de foie (0,03 ml de solution mitochondriale ou 0,03 ml de sérum) et 2,97 ml de NaCl 0,9% et 3 ml de réactif du biuret sont introduits. Après agitation au vortex, on laisse la coloration se développer pendant 20 min à la température ambiante.

La densité optique est lue à 550 nm contre le blanc constitué de 3 ml de NaCl 0,9% et 3 ml de réactif du biuret.

La concentration en protéines est calculée à l'aide d'une courbe d'étalonnage (annexe) réalisée à partir des résultats obtenus avec une gamme de sérum albumine bovin SAB (5mg/ml) (annexe)

2.2.8. Dosages de quelques marqueurs enzymatiques du statut oxydant au niveau hépatique

2.2.8.1. Activité de la catalase (CAT) (Sinha, 1972)

Principe :

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



Mode opératoire

Dans les cuves spectrophotométriques blanc et tests, nous avons introduit respectivement 12,5 µL d'eau distillée et 12,5 µL d'homogénat de foie 10%, puis 750 µL de tampon phosphate (0,1M ; pH 7,5), puis 50 µL de solution de H₂O₂ (50 mM). Une minute après, la réaction est stoppée par l'introduction dans chaque tube de 500 µL de solution dichromate 5% / acide acétique glacial (v/v).

Les tubes sont portés à ébullition (100°C) dans un bain marie pendant 10 minutes, puis refroidis à la température ambiante. L'absorbance du mélange obtenu a été lu à 570 nm contre le blanc.

L'activité de la catalase a été déterminée dans divers tubes à essai à l'aide d'une courbe d'étalonnage formée à partir d'une solution étalon d H₂O₂ 50 mM.

Tableau V: Réalisation de la courbe d'étalonnage pour le dosage de la catalase

Tubes	0	1	2	3	4
Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) 50 mM (µL)	0	20	40	80	160
Dichromate de potassium / acide acétique glacial (µL)	2000	2000	2000	2000	2000
Chauffer les tubes dans un bain marie à 100° C pendant 10 minutes et on obtient une coloration verte. Les tubes sont refroidis à température ambiante, puis de l'eau distillée est ajouté à chacun des tubes.					
Eau distillée (µL)	1000	980	960	920	840
Absorbances	0	0,028	0,048	0,095	0,186
Activité de la catalase (µmoles H ₂ O ₂ /min/mg de proteins)	0	2	4	8	16

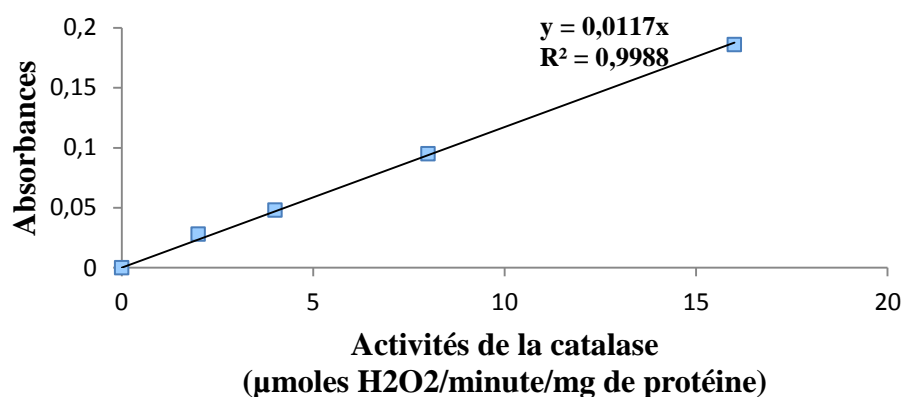


Figure 20: Courbe d'étalonnage pour le dosage de la catalase

(y: absorbance ; x: activité de la catalase (µmoles H₂O₂/minute/mg de protéine); R² : coefficient de corrélation)

2.2.8.2. Activité de la Superoxyde Dismutase (SOD) (Paoletti et al., 1986)

Principe

La présence de superoxyde dismutase (SOD) dans un échantillon inhibe l'oxydation de l'adrénaline dans l'adrénochrome. L'augmentation de l'absorbance qui est proportionnelle à l'activité de la SOD est notée entre 20 à 80 secondes à 480 nm.

Mode opératoire

Dans les cuves à spectrophotomètre blanc et tests, on introduit respectivement 134 μL d'eau distillée et 134 μL d'homogénat de foie 10%, puis 1666 μL de tampon carbonate (0,05 M ; pH 10,2) dans toutes les cuves. La réaction est déclenchée en ajoutant 200 μL d'adrénaline (0,03 mM) dans chaque tube. Le mélange est homogénéisé et la densité optique lue à 480 nm contre le blanc après 20 et 80 secondes.

L'activité de la SOD dans les différentes cuves a été définie en unité de SOD nécessaire pour causer une inhibition de 50% de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome pendant une minute. Cette activité en unité de SOD/mg de protéine a été déterminée par la formule :

Activité SOD = Nombre d'unité SOD/mg de protéine x facteur de dilution

avec:

- $\text{Nombre d'unité SOD/mg} = 100 - \left[\frac{(\Delta DO \text{ de l'échantillon}) \times 100}{\Delta DO \text{ blanc}} \right]$
- $\Delta DO = DO \text{ à } t_0 \text{ 20 secondes} - DO \text{ à } t_0 \text{ 80 secondes}$

2.2.8.3. Détermination du taux du dialdéhyde malonique (MDA)

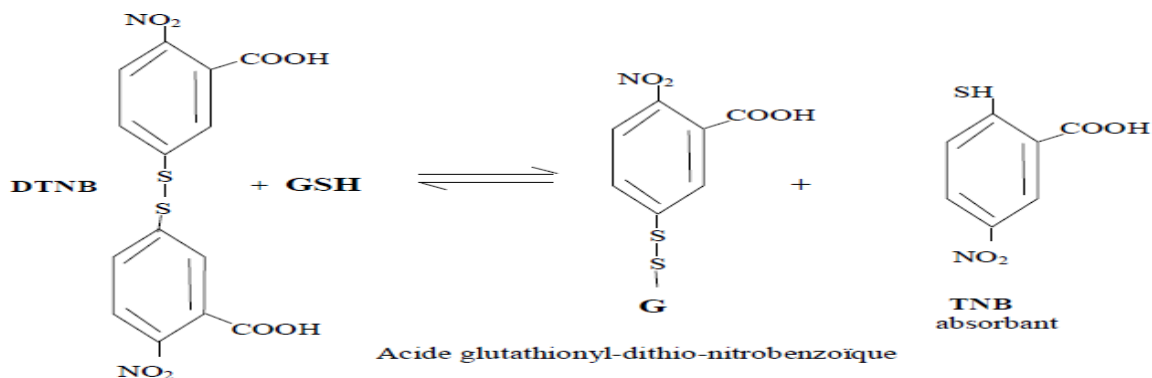
(Wilbur et al., 1949)

Le dosage du malonedialdéhyde s'est fait selon la méthode de Wilbur et al. (1949) décrite précédemment.

2.2.8.4. Détermination du taux de du Glutathion (Ellman, 1959)

Principe

L'acide dinitro-2,2'-dithio-5,5'-dibenzoïque (DTNB) réagit avec les groupements thiols (-SH) du glutathion et forme l'acide thionitrobenzoïque (TNB), un complexe de coloration jaune qui absorbe avec un maximum à 412 nm.



Mode opératoire

On introduit dans un tube à essai 20 μl d'échantillon (homogénat 10%) et 3ml de réactif d'Ellman. Après agitation, on laisse la coloration se développer pendant 60 min à la température ambiante. Les densités optiques sont lues à 412nm contre le blanc constitué de 20 μl de tampon Tris-HCl 50mM, pH 7,4 et 3ml de réactif d'Ellman.

La concentration en glutathion est calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire $\varepsilon = 13600 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

$$[\text{Glutathion}](\text{mM}/\text{mg protéines}) = \frac{DO \times V_{ts} \times 10^3}{\varepsilon_{\text{glutathion}} \times V_{sp} \times l \times Q_{\text{protéine}}}$$

Avec :

- DO = densité optique
- V_{ts} = volume total du surnageant (μl)
- $\varepsilon_{\text{glutathion}}$ = coefficient d'extinction molaire du glutathion = $13\,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- V_{sp} = volume de surnageant prélevé pour le dosage (μl)
- $Q_{\text{protéine}}$ = quantité totale de protéines dans le surnageant (mg)
- l = trajet optique (1cm)

2.2.9. Détection des marqueurs de la différenciation des cellules souches en hépatocytes : technique d'immunohistochimie/immunofluorescence

L'immunofluorescence permet la détection et la localisation d'une ou de plusieurs protéines tissulaires grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. Cette technique peut aussi être réalisée sur lames ou coupes flottantes (Mohan et al., 2008).

La réalisation d'un marquage passe par plusieurs étapes, allant du prétraitement du tissu à la pertinence du choix du fluochrome en passant par la sélection de l'anticorps primaire et détermination de sa dilution, la sélection de l'anticorps secondaire spécifique (Tsunoda et al., 2003).

Certaines substances possèdent la particularité d'émettre une lumière d'une certaine couleur lorsqu'elles sont illuminées par une source lumineuse d'une autre couleur : on dit qu'elles sont luminescentes (on parlera de fluorescences si la lumière émise est générée dans le millionième de seconde).

Le principe général de l'immunofluorescence est basé sur une réaction antigène-anticorps (AG-Ac) qui est visualisée grâce à une molécule fluorescente (fluorochrome ou fluorophore). Cet immuno-marquage peut être direct (anticorps primaire spécifique de l'antigène recherché) ou indirecte (anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire utilisé pour détecter l'antigène) (Mohan et al., 2008).

But de la manipulation

Le but de la manipulation est de révéler l'expression de marqueurs qui concourent au processus de l'évolution des cellules souches en hépatocytes.

Principe

Certaines protéines de l'organisme telle que Sox 17 peuvent être mises en évidence par des anticorps spécifiques couplés à des traceurs. L'expression de chaque marqueur se traduit par une coloration spécifique visible au microscope à fluorescence.

Afin de mettre en évidence le processus de maturation hépatocytaire via l'endoderme définitif sur des coupes de foie, le facteur de transcription Sox-17 a été mis en évidence par un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les acides aminés 171-300 cartographiant dans une région interne de Sox-17 d'origine humaine.

La révélation a été faite à la fluorescéine (FITC) par liaison à un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin IgG (sc-2012).

Plus l'intensité de la fluorescence est élevée, plus le marqueur spécifique est exprimée, traduisant un recrutement vers la formation de l'organe dont il est spécifique. C'est donc la détection dans ce cas précis de la l'apparition de Sox-17 qui permet de quantifier la différenciation cellulaire sur les coupes/préparations.

Mode opératoire

Les lames portant des coupes de 5 µm de foie incluent en paraffine ont séjourné dans les bains 1 à 9 durant la période consignée dans le tableau VI puis ont été recouvertes des différentes solutions des bains 10 à 20 dans une chambre humidifiée. A partir du bain 18, la chambre humidifiée a été mise dans une chambre noire.

Tableau VI: Procédure d'immunofluorescence

Ordre des bains	Nombre de bains	Bains	Temps de séjour (par bain)
/	/	Chauffer les lames à 60 °C	1 h
1	2	Xylène	5 min
2	2	Ethanol 100 °	5 min
3	1	Ethanol 90 °	5 min
4	1	Ethanol 80 °	5 min
5	1	Ethanol 70 °	5 min
6	1	Ethanol 50 °	5 min
7	1	Ethanol 30 °	5 min
8	2	PBS	5 min
9	1	Tampon citrate 10 Mm ; pH 6 à 80 °C	20 min
/	/	Equilibration à température ambiante	30 min
10	1	<i>Phosphate Buffered Saline (PBS)/ 0,2 % Triton X</i>	10 min
11	1	PBS	5 min
12	1	peroxyde d'hydrogène 0,5 % en méthanol	20 min
13	2	PBS	5 min
14	1	<i>Normal Goat Serum 10 % (NGS)</i>	20 min
15	1	Anticorps primaire Sox-17 (H-130) 1/200 en 1 % NGS	à 4 °C <i>overnight</i>
16	1	PBS/ 0,2 % Triton X	20 min
17	2	PBS	20 min
18*	1	Anticorps secondaire chèvre anti-lapin IgG-FITC	30 min
19	1	PBS/ 0,2 % Triton X	20 min
20	2	PBS	20 min

Après avoir subi les bains suscités, les lames ont été montées sous milieu non aqueux.

2.2.9.1. Le montage

Le montage permet de protéger les coupes et de les conserver. Pour se faire, les coupes colorées ont été couvertes par une fine lamelle de verre qui emprisonne un milieu de montage dont l'indice de réfraction est similaire à celui du verre.

Les milieux de montage utilisés sont des résines synthétiques (eukit ou pertex) qui ne sont pas miscibles à l'eau. Les coupes ont été déshydratées avant d'être montées selon le protocole consigné dans le tableau VII ci-dessous.

Tableau VII: Procédure de déshydratation avant le montage

Ordre des bains	Nombre de bains	Bains	Temps de séjour (par bain)
1	1	Eau distillée	5 min
2	1	Ethanol à 70 °	5 min
3	1	Ethanol 95 °	5 min
4	3	Ethanol 100 °	5 min
5	3	Xylène	5 min

2.2.9.2. Mesure de la fluorescence cellulaire en utilisant le logiciel *image J*

La quantification de la fluorescence s'est faite en utilisant le logiciel *Image J*. En effet, le niveau de fluorescence cellulaire issu d'un microscope à fluorescence Le test a été déterminé au moyen du logiciel *imageJ*. Le logiciel *imageJ* a été téléchargé (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) et utilisé dans le cadre de ce travail. La cellule d'intérêt est sélectionnée en utilisant l'onglet de sélection (rectangle, polygone ou cercle). Dans le menu, nous avons sélectionné "set measurements" en s'assurant de sélectionner au préalable les options 'area integrated intensity' et 'mean grey value'. Par la suite et dans le menu analyse, nous avons sélectionné "measure". Il est à noter qu'une région proche de la cellule d'intérêt et ne présentant pas de fluorescence a été sélectionnée et utilisée comme *background*. Cette étape a été répétée pour les autres cellules dans le champ visuel utilisé pour la mesure de la fluorescence. Les résultats à la fin de l'analyse sont copiés dans une page Excel et la fluorescence est calculée en utilisant la formule suivante:

CTCF: corrected total cell fluorescence (CTCF).

Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) = Integrated Density – (Area of selected cell x Mean fluorescence of background readings)

2.2.10. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ESM. Les données ont été analysées par une analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivie d'un test de comparaisons multiples Dunnett, en utilisant le logiciel GraphPad prism 5.0. Une différence a été considérée comme statistiquement significative à $p < 0,05$.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. RESULTATS

Les résultats obtenus ont été répartis en deux sections.

Dans la première section, il sera question d'une part de présenter le pouvoir antioxydant des extraits de *D. adscendens* et ses propriétés antihépatotoxiques sur les hépatocytes de rats fraîchement isolés et d'autre part de présenter l'effet de *D. adscendens* sur les réplicons subgénomiques de génotype 1b du virus de l'hépatite C (VHC) et sur son cycle infectieux (VHC).

Dans la deuxième section, il sera présenté les potentialités hépatoprotectrices de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur des modèles d'hépatopathies induits expérimentalement suivi de l'effet de cet extrait sur l'expression de quelques marqueurs du processus de différenciation et de la maturation hépatocytaire.

3.1.1. Le rendement d'extraction

Le tableau VIII présente les rendements d'extraction à l'eau de *Desmodium adscendens* obtenus avant et après floraison de la plante.

Tableau VIII: Rendement d'extraction des plantes étudiées

	DA avant floraison	DA après floraison
Masse de la plante utilisée (g)	100	100
Quantité d'extrait sec obtenu (g)	12,48	9,30
Rendement d'extraction (%)	12,48	9,30

3.1.2. Propriétés antioxydantes des extraits et leurs effets anti-hépatotoxiques *in vitro* sur le modèle de toxicité induit sur des hépatocytes primaires de rats par le CCl₄

3.1.2.1. Propriétés antioxydantes

Le pouvoir antioxydant des extraits de *D. adscendens* a été évalué par leur capacité à piéger les radicaux libres, à réduire les ions ferriques, à réduire le molybdate et à inhiber la peroxydation lipidique.

3.1.2.1.1. Activités antiradicalaires

3.1.2.1.2. Test de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

L'effet antioxydant des extraits de DA sur le radical DPPH est illustré à la figure 21.

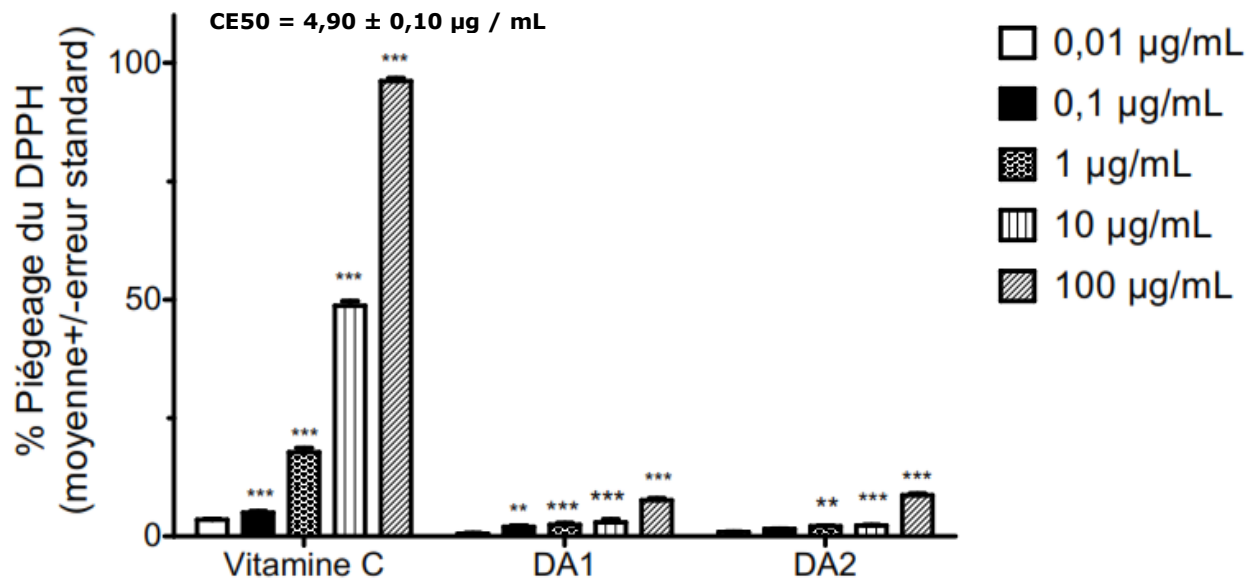


Figure 21: Comparaison des activités de piégeage du DPPH par les extraits de plantes (DA1 et DA2) et l'acide ascorbique (vitamine C), appelés piégeurs de radicaux DPPH

Les valeurs sont la moyenne \pm ESM de deux expériences indépendantes en triple. Les comparaisons ont été faites entre les différentes doses pour un même groupe ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ par rapport au groupe $0,01 \mu\text{g} / \text{mL}$. DA1 et DA2 représentent les extraits aqueux de *D. adscendens* récoltés respectivement avant et après la floraison.

Les résultats indiquent que la vitamine C, utilisée comme contrôle positif, piège le radical DPPH de façon dose dépendante avec environ 98% d'inhibition à $100 \mu\text{g} / \text{mL}$. Une activité similaire a également été trouvée avec DA1 et DA2 dans une moindre mesure. Les deux extraits ont entraîné une inhibition d'environ 8% (7,59% pour DA avant la floraison (DA1) et 8,69% pour DA après la floraison (DA2)) lorsqu'ils ont été testés à $100 \mu\text{g} / \text{mL}$. La CE50 de la vitamine C était de $4,90 \pm 0,10 \mu\text{g} / \text{mL}$ tandis que celles des extraits avaient une $\text{CE50} > 100 \mu\text{g} / \text{mL}$.

3.1.2.1.3. Test de piégeage du radical hydroxyle (HO°)

Les effets des extraits de DA sur le radical HO° sont présentés à la figure 22.

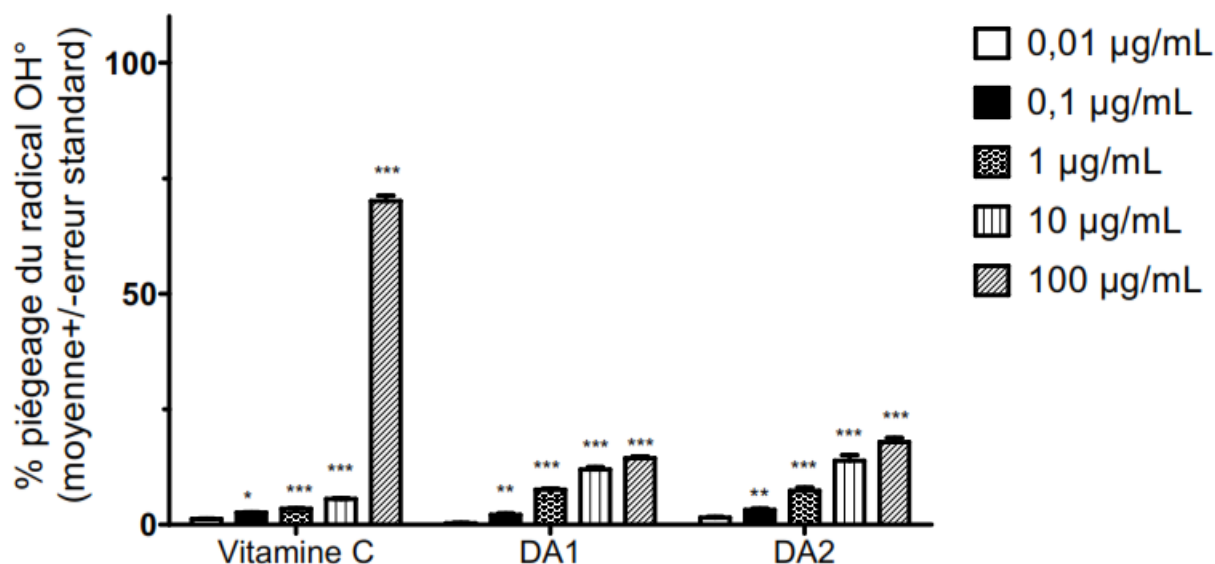


Figure 22: Activités de piégeage des radicaux hydroxyles (OH°) des extraits de plantes (DA1 et DA2) et de la vitamine C

Les valeurs sont la moyenne \pm ESM de deux expériences indépendantes en triple. Les comparaisons ont été faites entre les différentes doses pour un même groupe * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ par rapport au groupe 0,01 $\mu\text{g} / \text{mL}$. DA1 et DA2 représentent les extraits aqueux de *D. adscendens* récoltés respectivement avant et après la floraison.

Comme le montre cette figure, l'activité de piégeage de OH° par les extraits de DA était significativement inférieure à celle de la vitamine C. DA1 et DA2 présentaient une activité concentration-dépendante avec une meilleure activité observée à la dose de 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$. La CE50 des extraits était $> 100 \mu\text{g} / \text{mL}$.

3.1.2.2. Activités réductrices

3.1.2.2.1. Réduction du ferricyanure de potassium

Les pouvoirs réducteurs des ions ferriques par des extraits aqueux de *D. adscendens* sont présentés à la figure 23.

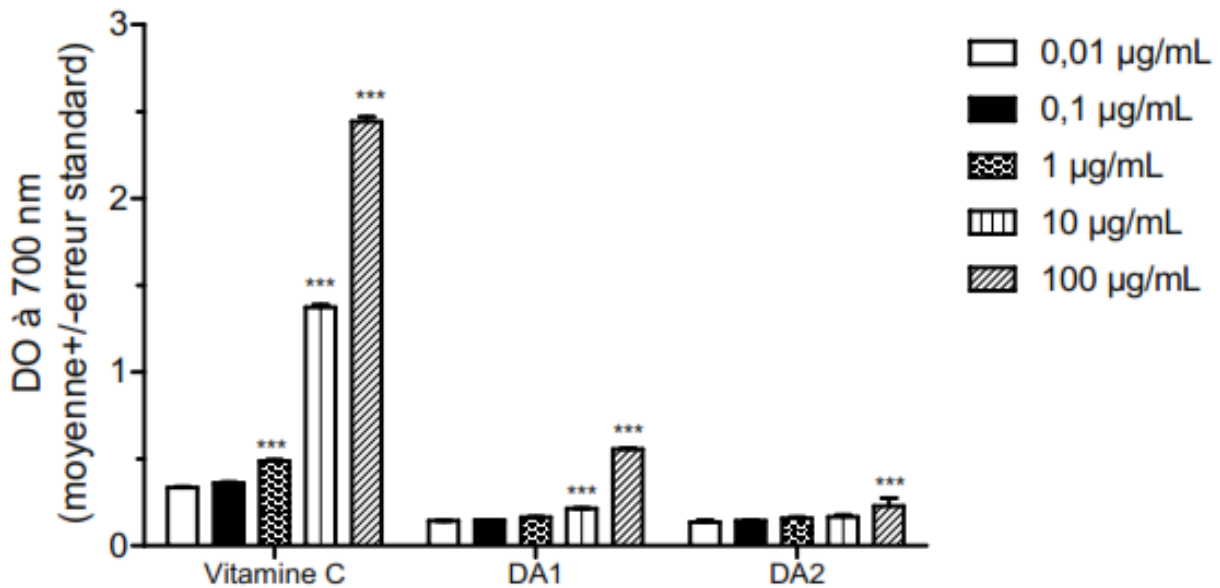


Figure 23: Réduction de la capacité des ions ferriques par DA1, DA2 et l'acide ascorbique

Les valeurs sont la moyenne \pm ESM de deux expériences indépendantes en triple. Les comparaisons ont été faites entre les différentes doses pour un même groupe : *** $p < 0,001$ par rapport au groupe $0,01 \mu\text{g} / \text{mL}$. DA1 et DA2 représentent les extraits aqueux de *D. adscendens* récoltés respectivement avant et après la floraison.

À la concentration de $100 \mu\text{g} / \text{mL}$, DA1 et DA2 ont montré une capacité de réduction significativement plus élevée ($p < 0,001$) que dans le groupe témoin de 0,55 et 0,28 respectivement. Un effet concentration-dépendante a été observé avec DA1 à 10 et $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ tandis que DA2 ne présentait qu'un effet significatif à $100 \mu\text{g} / \text{mL}$. La vitamine C présente une inhibition dépendante de la concentration avec une $\text{CI}_{50} < 10 \mu\text{g} / \text{mL}$, ce qui suggère que le composé de référence s'est révélé plus actif que les échantillons de plantes.

3.1.2.2.2. Réduction du molybdate

La capacité antioxydante totale des extraits de DA exprimée en meq / g de l'extrait est présentée dans la figure 24.

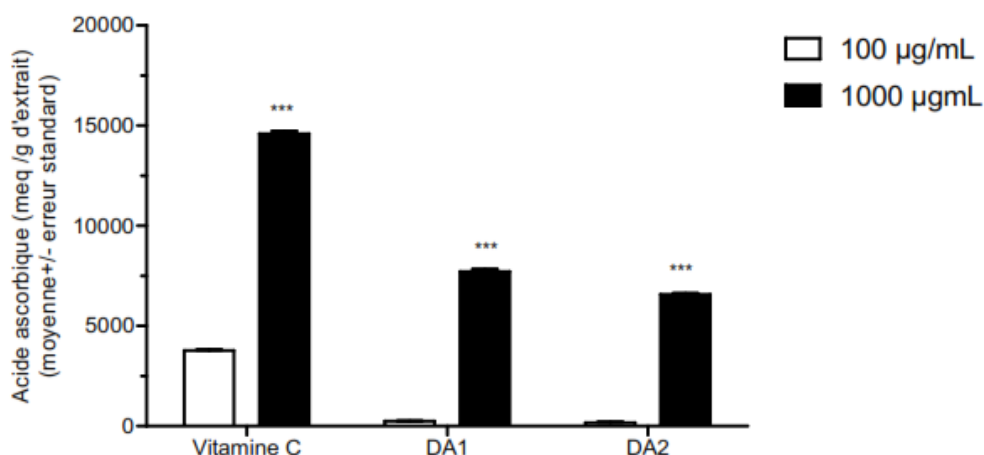


Figure 24: Capacité antioxydante totale (réduction du molybdate) des extraits de plantes (DA1 et DA2) et de la vitamine C

Les valeurs sont la moyenne \pm ESM de deux expériences indépendantes en triple. Les comparaisons ont été faites entre les différentes doses pour un même groupe *** $P < 0,001$ par rapport au groupe $100 \mu\text{g} / \text{mL}$. DA1 et DA2 représentent les extraits aqueux de *D. adscendens* récoltés respectivement avant et après la floraison.

Selon cette figure, tous ces extraits ont une capacité antioxydante notable sur la réduction du molybdate. La vitamine C, DA1 ont respectivement une IC_{50} de $1,11 \pm 0,09 \mu\text{g} / \text{mL}$ et $47,32 \pm 12,38 \mu\text{g} / \text{mL}$ tandis que l' IC_{50} de DA2 est $> 100 \mu\text{g} / \text{mL}$.

3.1.2.2.3. Activité d'inhibition de la peroxydation lipidique

La figure 25 présente les effets des extraits de *D. adscendens* sur l'inhibition *in vitro* de la peroxydation lipidique induite dans les homogénats de foie de rat.

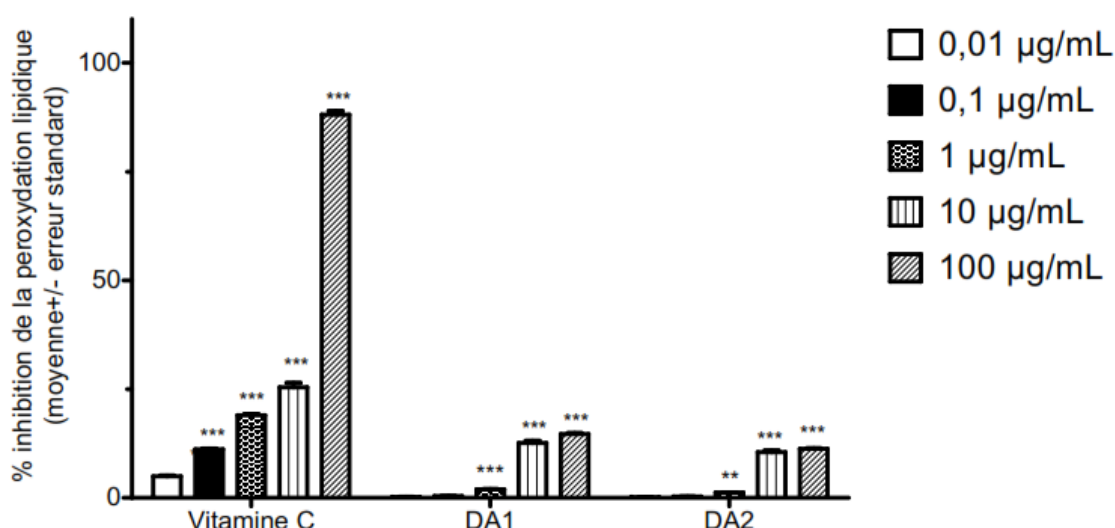


Figure 25: Inhibition de la peroxydation lipidique par DA1, DA2 et l'acide ascorbique

Les valeurs sont la moyenne \pm ESM de deux expériences indépendantes en triple. Les comparaisons ont été faites entre les différentes doses pour un même groupe. ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ par rapport au groupe $0,01 \mu\text{g}/\text{mL}$. DA1 et DA2 représentent les extraits aqueux de *D. adscendens* récoltés respectivement avant et après la floraison.

À 100 µg/mL, DA1 et DA2 présentaient respectivement une inhibition de 14,66 et 11,28%. Par rapport à la vitamine C (IC₅₀ 13,28 ± 0,55 µg/mL), les deux extraits ont une inhibition modérée de la peroxydation lipidique (IC₅₀>100 µg/mL) comme indiqué sur la figure 25.

3.1.3. Effet anti-hépatotoxique des extraits aqueux de *D. adscendens* contre la toxicité induite par le CCl₄ sur des hépatocytes de rats fraîchement isolés

3.1.3.1. Rendement d'isolement et pourcentage de viabilité cellulaire

Quatre isollements consécutifs d'hépatocytes ont permis d'obtenir un rendement d'isolement et un pourcentage moyen de viabilité cellulaire. Les valeurs obtenues sont consignées dans le tableau IX ci-dessous.

Tableau IX: Rendement d'isolement et pourcentage de viabilité cellulaire

Isolement N°	1	2	3	4
Nombre d'hépatocytes/g de foie (millions)	4,51	4,07	3,56	4,5
Viabilité au bleu trypan (%)	90	92	91	89

Il en résulte que pour 1 g de foie, on obtient un rendement moyen d'isolement de 4,16 ± 0,44 millions de cellules et une viabilité moyenne de 90,5 ± 1,29%.

3.1.3.2. Effet du temps sur la viabilité des hépatocytes

La viabilité des hépatocytes d'une part et l'intégrité des membranes d'autre part ont été déterminés toutes les 2 heures pendant 12 heures de temps. Les figures 26 et 27 présentent respectivement les pourcentages de viabilité cellulaire et les activités de l'alanine aminotransférase (ALAT) obtenues en fonction du temps.

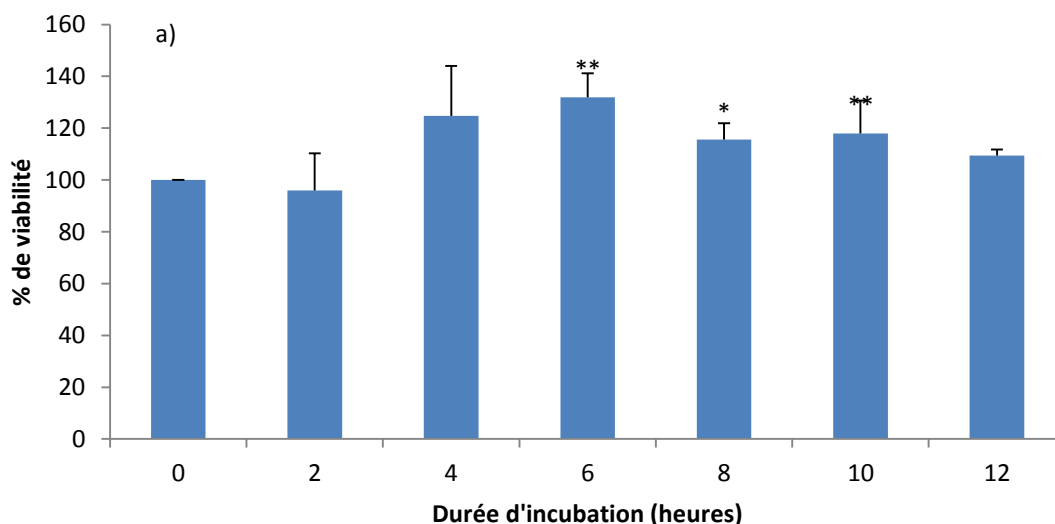


Figure 26: Viabilité des hépatocytes en fonction du temps

Les valeurs sont les moyennes \pm ESM de 2 essais différents en triple. Valeurs statistiquement différentes au témoin (temps 0) à * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

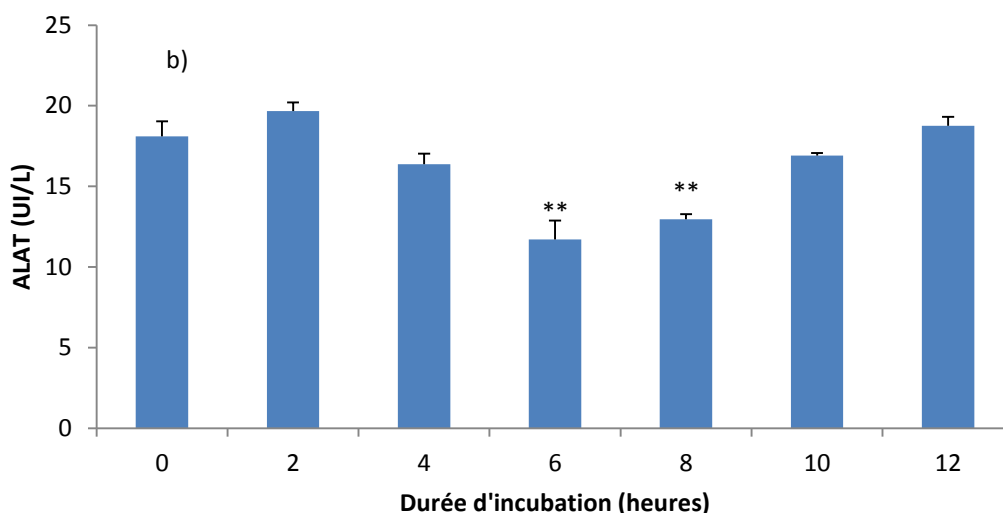


Figure 27: Variation de l'activité de l'ALAT en fonction du temps

Les valeurs sont les moyennes \pm ESM de 2 essais différents en triple. Valeurs statistiquement différentes au témoin (temps 0) à ** $p < 0,01$.

On note de ces résultats que la viabilité des cellules est élevée pendant les douze heures d'incubation. L'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale par le test au MTT (Figure 26) des hépatocytes est maximale après six heures d'incubation, traduisant une forte viabilité cellulaire. Parallèlement, on note après cette même période une activité basse de l'ALAT dans le milieu de culture (Figure 27), traduisant un maintien de l'intégrité des membranes. De ces deux observations, il en découle que 6 heures est la durée d'incubation qui sera utilisée dans les expérimentations qui suivront.

3.1.3.3. Effet des extraits sur la viabilité des hépatocytes

La viabilité des cellules et l'intégrité de leur membrane ont été déterminées en présence des extraits de *D. adscendens* et les résultats présentées aux figures 28a et 28b.

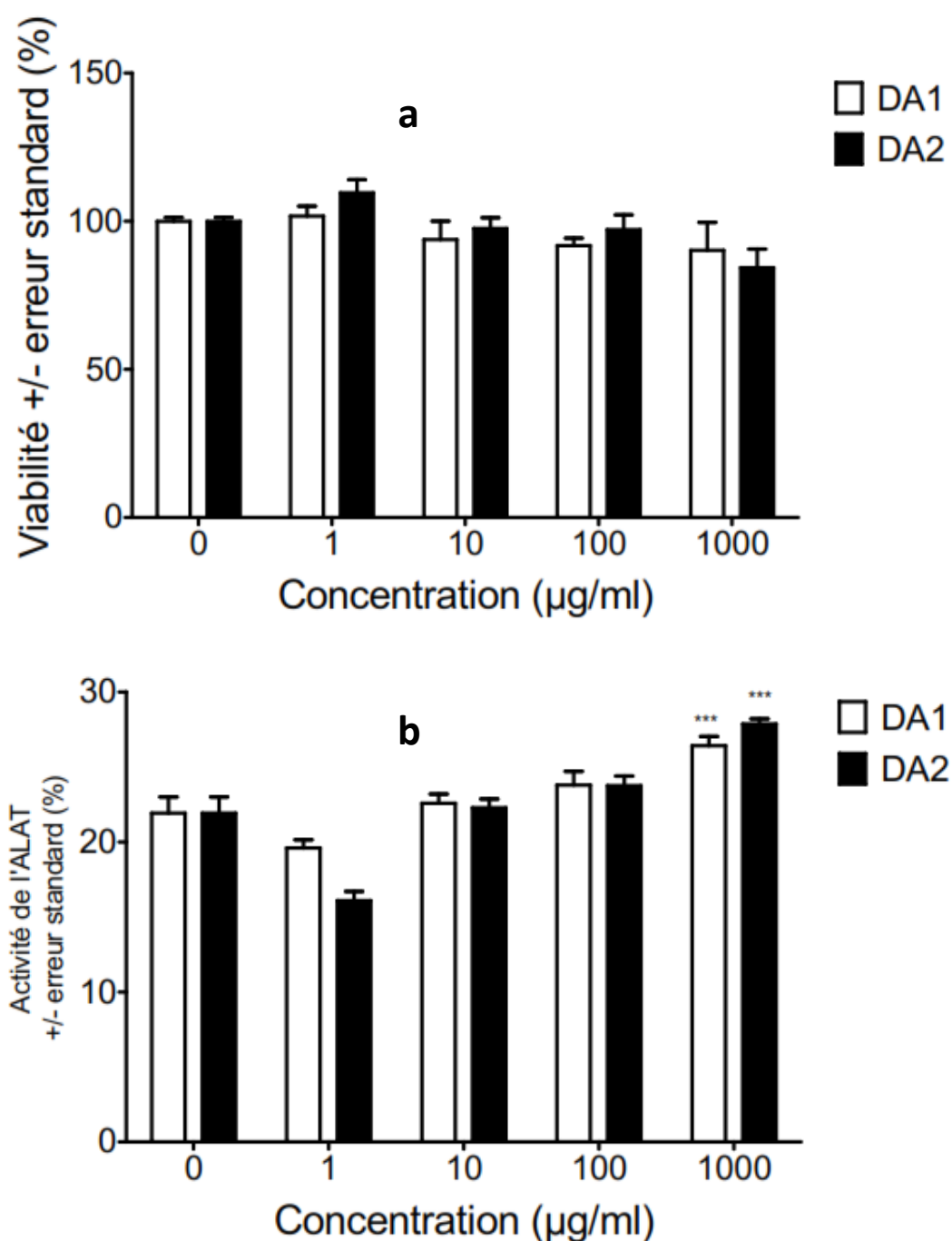


Figure 28: Effet d'extraits de plantes (DA1 et DA2) sur la viabilité cellulaire (a) et la libération d'ALAT (b)

Les valeurs sont la moyenne \pm ESM de deux expériences indépendantes en triple *** $p < 0,001$; par rapport au contrôle (0 mM). DA1 et DA2 représentent les extraits aqueux de *D. adscendens* récoltés respectivement avant et après la floraison.

Il en ressort que la viabilité des hépatocytes dans le prétraitement avec des extraits de plantes (figure 28a) n'est pas affectée par des concentrations croissantes d'extraits de DA1, contrairement à DA2 qui diminue de manière significative la viabilité des hépatocytes à partir de 100 µg/mL. Par ailleurs, de faibles concentrations (1 et 10 µg/mL) de DA1 et DA2 diminuent significativement la libération d'ALAT dans le milieu de culture (figure 28b). Cependant, à des concentrations élevées (1000 µg / ml), tous les extraits affectent négativement l'intégrité de la membrane caractérisée par l'augmentation de l'activité de l'ALAT.

3.1.3.4. Effet des concentrations variables du tétrachlorure de carbone sur la viabilité des hépatocytes : détermination de la concentration létale 50

Les hépatocytes suspendus dans le milieu de culture ont été incubés en présence du tétrachlorure de carbone à différentes concentrations pendant 6 heures. Le test de viabilité et la mesure de l'activité de l'ALAT ont été réalisés. Les figures 29a et 29b présentent respectivement les courbes de viabilité des cellules dans le milieu et celles de l'activité de l'ALAT lors de l'intoxication par le CCl₄.

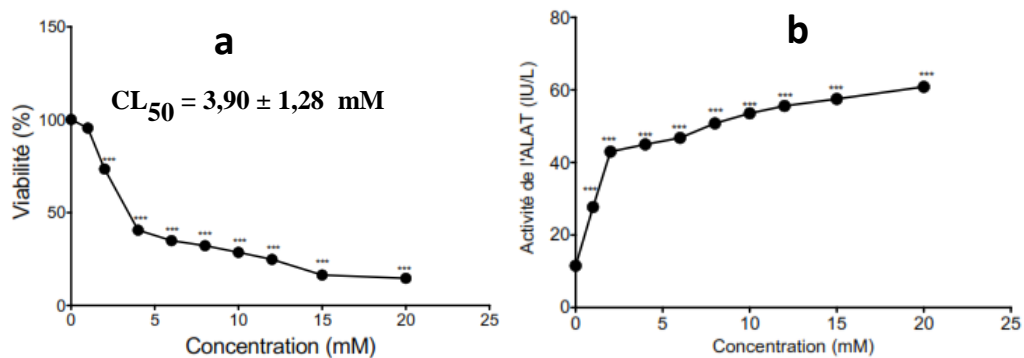


Figure 29: Baisse de la viabilité cellulaire (a) et augmentation de l'activité extracellulaire de l'ALAT (b) des hépatocytes intoxiqués au CCl₄

Les valeurs sont la moyenne ± ESM de deux expériences indépendantes en triple. Valeur statistiquement (***) $p < 0,001$ par rapport au contrôle (0 mM).

3.1.3.5. Effets du pré-traitement avec *D. adscendens* avant induction de la toxicité par le CCl₄ sur la viabilité hépatocytaire, l'activité de l'ALAT et le taux de MDA.

Les figures 30a, 30b et 30c représentent respectivement la mesure de la viabilité cellulaire, l'activité de l'ALAT et le taux de MDA lorsque les hépatocytes sont prétraités par les extraits de *D. adscendens* avant intoxication par le CCl₄.

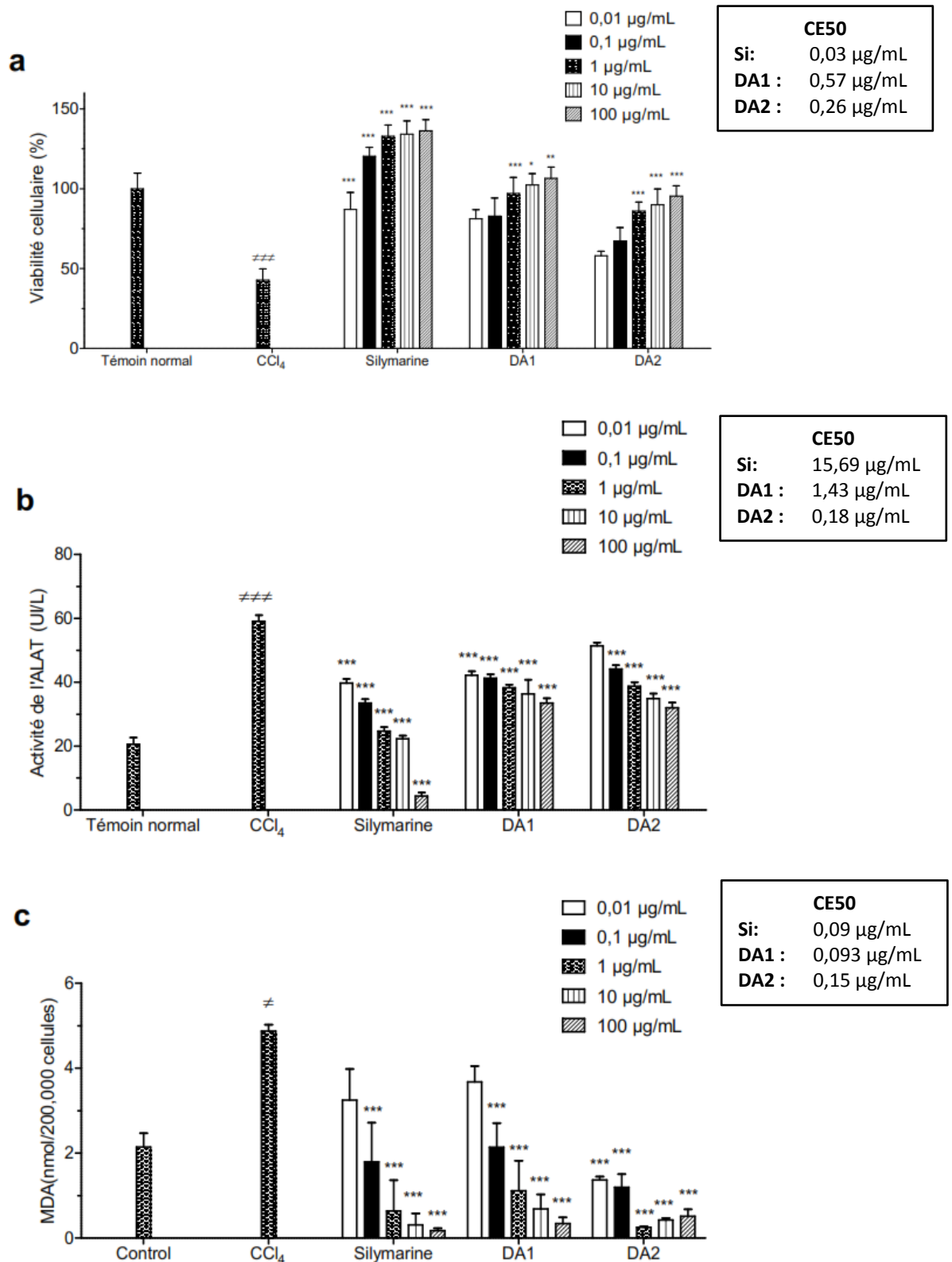


Figure 30: Effet des extraits de DA1 et DA2 en prétraitement sur la viabilité des hépatocytes (a), la libération de l'ALAT (b) et l'oxydation de la membrane lipidique (c)

Les valeurs sont la moyenne \pm ESM de deux expériences indépendantes en triple. ## $p < 0,01$ et ### $P < 0,001$ par rapport au groupe témoin; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ par rapport au groupe intoxiqué par CCl₄. DA1 et DA2 représentent les extraits aqueux de *D. adscendens* récoltés respectivement avant et après la floraison.

L'incubation de cellules avec le CCl₄ (5 mM) pendant 6 h a entraîné une diminution significative de la viabilité cellulaire ($p < 0,01$) (Figure 30a), une augmentation des fuites d'ALAT ($p < 0,001$) (Figure 30b) et la formation de MDA ($p < 0,001$) (Figure 10c) dans le groupe toxique.

Le prétraitement des hépatocytes avec les extraits de plantes (DA1 et DA2) ou la silymarine avant l'intoxication induit un effet protecteur et inhibiteur concentration-dépendante sur la viabilité cellulaire, les fuites d'ALAT et la production de MDA. En effet, les hépatocytes prétraités avec les extraits DA1 et DA2 (Figure 30a) montrent une meilleure signification ($p < 0,05$) de l'augmentation de la viabilité cellulaire à une concentration de 1 µg/mL, par rapport au groupe CCl₄. Les effets sur l'activité ALAT (Figure 30b) corroborent ces observations. En effet, DA1 et DA2 induisent une meilleure réduction ($p < 0,001$) de l'activité de l'ALAT à cette concentration. Par ailleurs, à cette même concentration, DA1 et DA2 diminuent significativement ($p < 0,001$) le niveau de MDA (Figure 30c).

La silymarine, un composé hépatoprotecteur de référence, présente une augmentation significative ($p < 0,05$) de la viabilité cellulaire à partir de la dose de 1 µg/mL et une diminution significative ($p < 0,001$) de la libération et de la production d'ALAT et de MDA respectivement.

3.1.3.6. Effets hépatocurateurs des extraits après induction de la toxicité par le CCl₄ sur la viabilité hépatocytaire, l'activité de l'ALAT et le taux de MDA

Les figures 31a, 31b et 31c représentent respectivement le pourcentage de viabilité cellulaire, l'activité de l'ALAT et la concentration de MDA lorsque les hépatocytes sont intoxiqués avec le CCl₄ avant l'administration des extraits de *D. adscendens*.

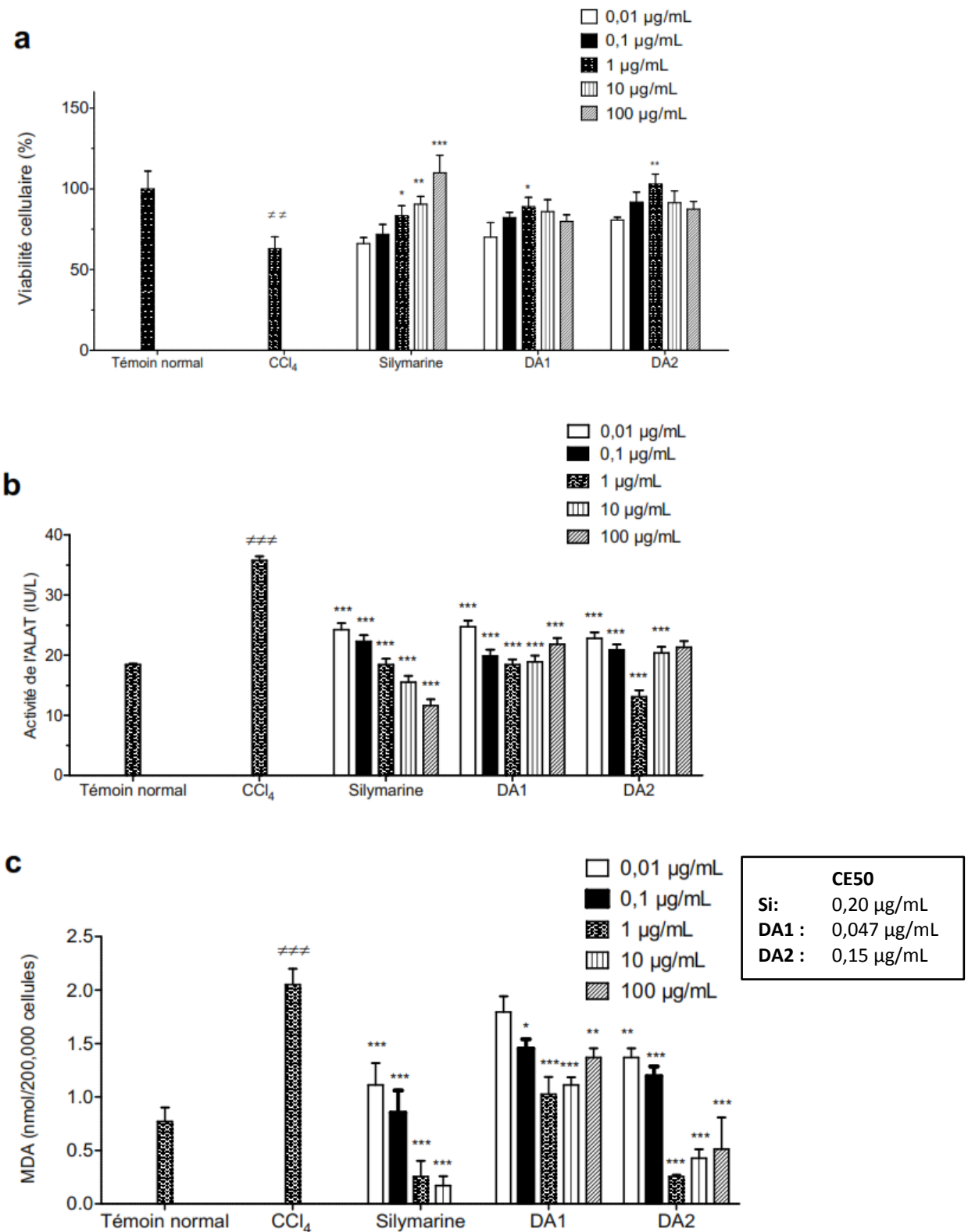


Figure 31: Effet d'extraits de plantes (DA1 et DA2) en post-traitement sur la viabilité des hépatocytes (a), la libération de l'ALAT (b) et l'oxydation de la membrane lipidique

Les valeurs sont la moyenne \pm ESM de deux expériences indépendantes en triple. # $p < 0,05$ et ### $p < 0,001$ par rapport au groupe témoin; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ par rapport au groupe intoxiqué par CCl₄. DA1 et DA2 représentent les extraits aqueux de *D. ascendens* récoltés respectivement avant et après la floraison.

Les figures 31a et 31b représentent respectivement le pourcentage de viabilité cellulaire et de l'activité ALAT lorsque les hépatocytes sont préincubés en présence de CCl₄, puis traités avec des extraits de plantes.

Dans le traitement hépatocuratif, la silymarine (standard) et les extraits de DA1 et DA2 augmentent significativement ($p < 0,001$) et de façon dose-dépendante, la viabilité des hépatocytes (Figure 31a). Ce résultat corrobore leur effet sur l'activité de l'ALAT qui diminue significativement ($p < 0,001$) en fonction des concentrations croissantes de ces extraits et de la silymarine (Figure 31b), avec une meilleure activité observée à la concentration de 100 µg/mL. Cependant, les extraits (DA1 et DA2) et la Silymarine diminuent significativement ($p < 0,001$) et de façon dose-dépendante, le taux de MDA (Figure 31c).

3.1.4. Evaluations *in vitro* des effets de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur les réplicons subgénomiques de génotype 1b du Virus de l'hépatite C (VHC) et sur l'activité antivirale son cycle infectieux

3.1.4.1. Effets de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur les réplicons subgénomiques de génotype 1b du VHC

Les propriétés inhibitrices de *D. adscendens* ont été d'abord examinées sur la réplication virale en utilisant des cellules LucUbiNeo-ET, qui sont des systèmes arborant un réplicon subgénomique bicistronique de génotype 1b du VHC.

Les agents antiviraux comme par exemple un inhibiteur des protéines non structurales NS3, le Telaprevir, est aujourd'hui une des molécules de choix dans le traitement de l'hépatite C chronique.

La figure 32a présente le pourcentage de viabilité des cellules aux différentes concentrations de notre extrait et la figure 32b présente l'effet comparé de l'activité de notre extrait à celle de cet inhibiteur qui cible une protéine précise sur le complexe de réplication du VHC.

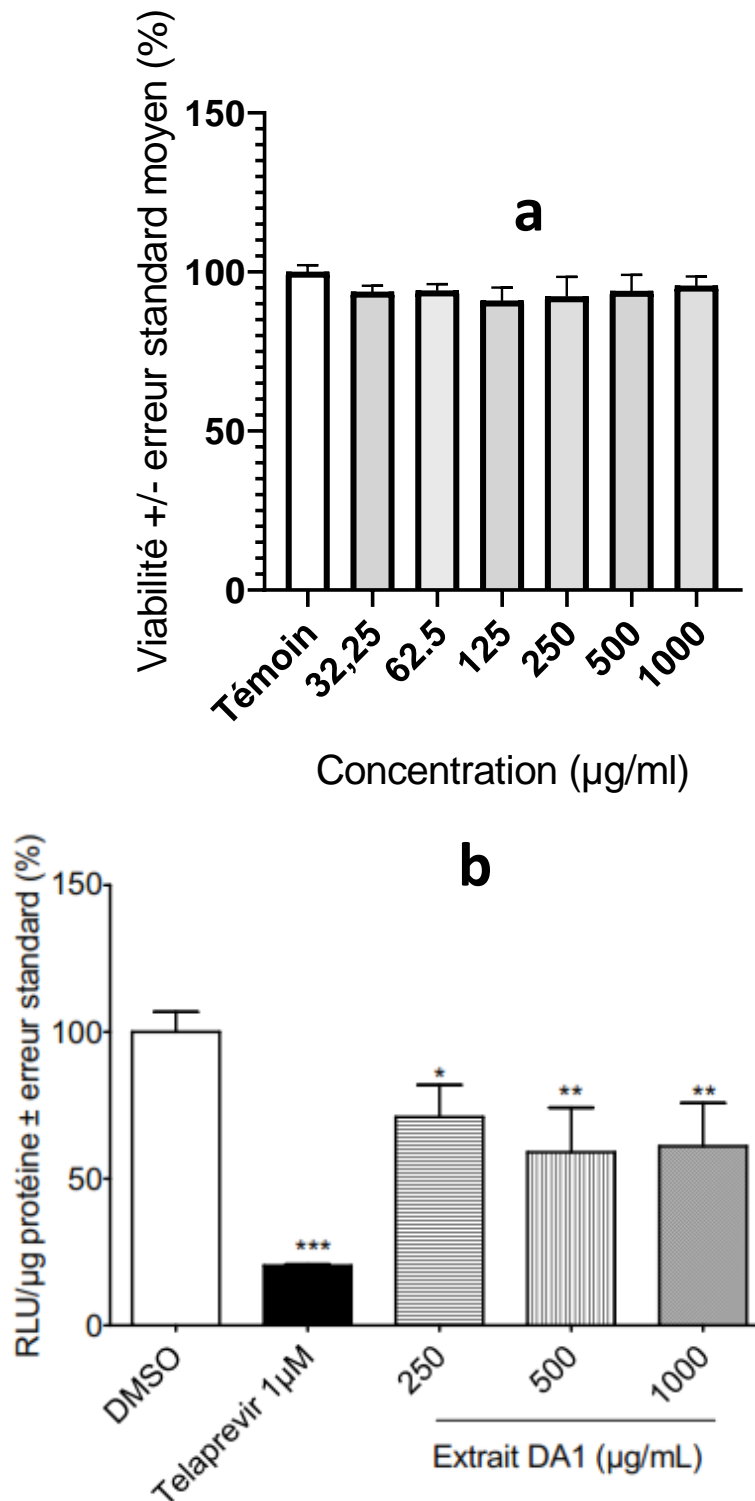


Figure 32: Pourcentage de viabilité des cellules (a) et inhibition de la réplication du VHC par l'extrait aqueux de *D. adscendens* dans les cellules LucUbiNeo-ET (b)

Les cellules LucUbiNeo-ET ont été traitées avec différentes concentrations d'extrait de DA1 ou de télaprevir 1 µM ou 0,1% de DMSO et analysées pour les activités relatives de luciférase après une incubation de 24 h. Les valeurs sont la moyenne ± ESM de deux expériences indépendantes en triple. Les résultats sont présentés en pourcentage de viabilité calculé par rapport aux cellules non traitées (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$). DA1 représente les extraits aqueux de *D. adscendens* récoltés avant la floraison.

Pour évaluer l'effet de l'extrait de DA1 sur la réplication du VHC, nous avons utilisé des cellules LucUbiNeo-ET qui contiennent un réplicon d'ARN sous-génomique du VHC et expriment l'enzyme luciférase comme système rapporteur. Nous notons une réduction significative ($p < 0,01$ et $p < 0,001$) des valeurs de luciférase aux différentes concentrations testées de DA1, comparativement au groupe traité au DMSO, indiquant par conséquent une inhibition efficace de la réplication du VHC. Cependant, cette diminution était inférieure à celles du Téléprévir 1 μM utilisé ici comme contrôle positif.

3.1.4.2. Effets de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur l'activité antivirale du cycle infectieux VHC

Compte tenu des activités hépatoprotectrices de *D. adscendens* sur le stress oxydatif, nous avons émis l'hypothèse de ses effets sur l'infection par le VHC. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons testé l'effet de l'extrait aqueux de *D. adscendens* (DA1) sur le cycle viral complet qui a été évalué par immunofluorescence indirecte en utilisant des particules virales de type HCVcc. Il s'agit de particules de VHC de génotype 2a (JFH-1) capables d'infecter des hépatocytes en culture, de se répliquer et de produire des virions infectieux. Les cellules Huh7 ont été inoculées avec du HCVcc en présence *D. adscendens* (DA1) pendant une période de 30h, puis le taux d'infection a été évalué. Dans le témoin DMSO, les traitements ont été effectués de manière à obtenir environ 30% de cellules infectées. Le taux d'infection a été analysée en comptant les cellules positives (expression) à la glycoprotéine E1 (marqueur viral) et le nombre de noyaux positifs au test d'immunofluorescence indirecte (DAPI), caractéristique des cellules viables.

La figure 33a présente les résultats obtenus avec DA1. La figure 33b présente l'effet des différentes substances sur le nombre de noyau cellulaire, matérialisant l'évaluation de la cytotoxicité de l'extrait.

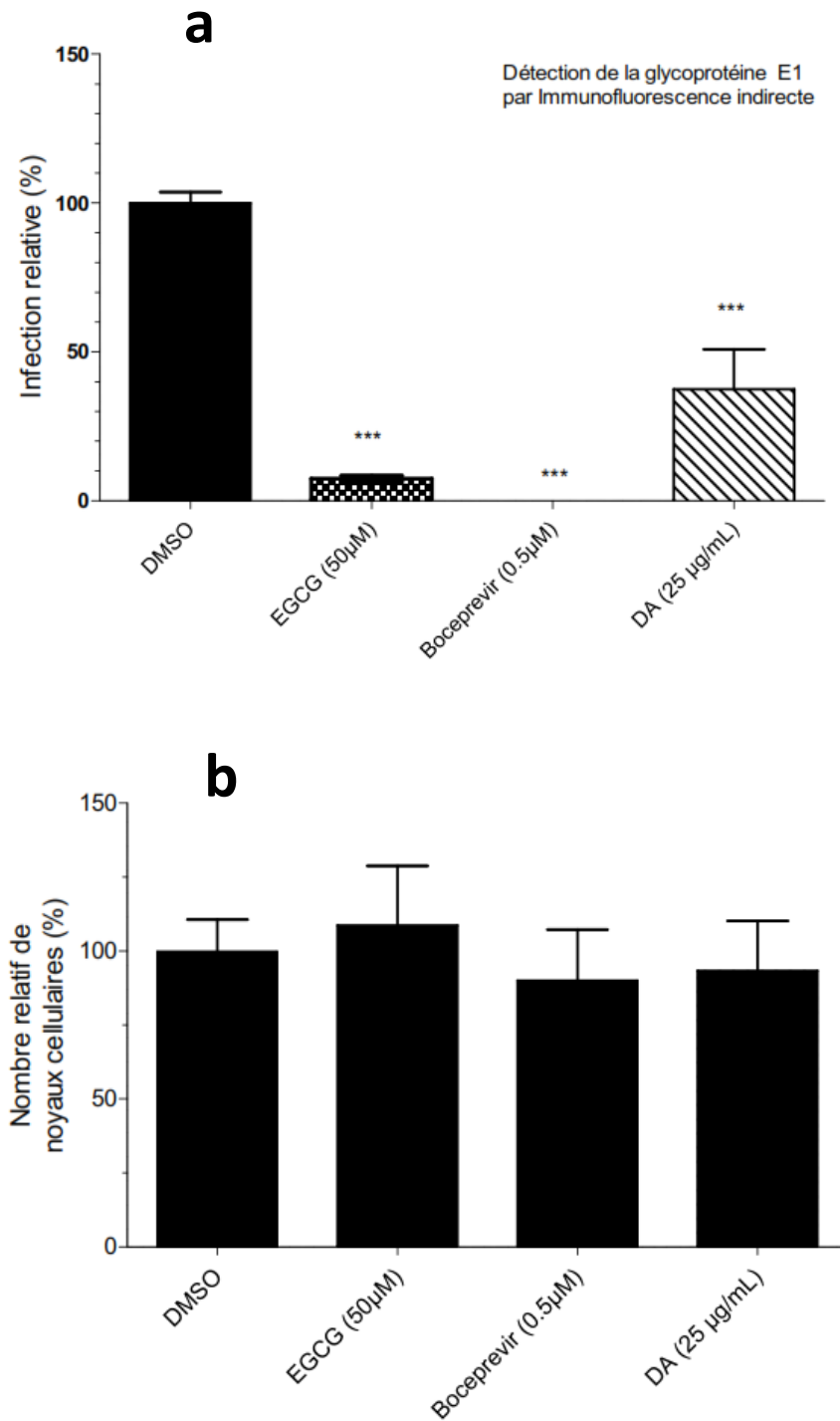


Figure 33: L'extrait de *D. adscendens* (DA) inhibe l'infection par HCVcc (a) et ne modifie pas le nombre relatif de noyaux cellulaires (b)

(a) Les cellules Huh-7 ont été inoculées avec HCVcc en présence d'EGCG 50 μM ou d'extrait DA à 25 μg / ml et incubées pendant 2 h. L'inoculum a été retiré et remplacé par un milieu frais contenant de l'extrait de DA1 et incubé pendant 28 h. Le DMSO a été utilisé comme témoin normal. Le Bocéprevir à 0,5 μM a été ajouté uniquement pendant l'étape post-infection pour leur effet sur la réplication. Les données ont été normalisées par rapport au contrôle DMSO, qui est exprimé comme une infection à 100%. Les valeurs sont la moyenne ± ESM de deux expériences indépendantes en triple. Les résultats sont présentés en pourcentage de viabilité calculé par rapport aux cellules non traitées (** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$). DA1 représente les extraits aqueux de *D. adscendens* récoltés avant la floraison.

Il en ressort que l'évaluation de la cytotoxicité des cellules, matérialisée par le nombre relatif de noyaux cellulaires en présence des différentes substances aux concentrations utilisées n'est pas affectée (33b). Par ailleurs, comme le montre la figure 33a, l'extrait de DA à 25 µg/mL a significativement ($p < 0,01$) réduit l'infection par le VHC dans les systèmes de HCVcc par rapport au groupe traité au DMSO. Une réponse plus prononcée a été trouvée avec le Bocéprévir et l'EGCG utilisés comme composés standards.

Les cellules Huh-7 ont été inoculées avec HCVcc en présence d'EGCG 50 µM ou d'extrait DA à 25 µg/mL et incubées pendant 2 h. L'inoculum a été retiré et remplacé par un milieu frais contenant de l'extrait de DA1 et incubé pendant 28 h. Le DMSO a été utilisé comme témoin normal. Le Bocéprévir à 0,5 µM a été ajouté au contrôle positif uniquement pendant l'étape post-infection pour leur effet sur la réplication. Les données ont été normalisées par rapport au contrôle DMSO, qui est exprimé comme une infection à 100%.

3.1.4.3. Conclusion partielle 1

Au terme de cette première partie de notre travail dont l'objectif était d'évaluer *in vitro* l'effet de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur les lésions aiguës induites par le CCl₄ sur des hépatocytes de rats fraîchement isolés et sur des réplicons subgénomiques de génotype 1b du VHC et le cycle infectieux du VHC, il ressort que les extraits aqueux de *D. adscendens* ne sont pas toxiques pour les hépatocytes aux concentrations de 0,01 à 1000 µg/ml (avant floraison) et de 0,01 à 100 µg/ml (après floraison) et sont hépatoprotecteur et hépatocurateuraux concentrations de 0,01 ; 0,1 et 1 µg/ml. Par ailleurs, cet extrait aqueux de *D. adscendens* inhibe significativement l'expression de l'ARN du VHC dans des réplicons subgénomiques 1b.

Il se dégage donc clairement que *D. adscendens* protège le foie des dommages qu'ils soient toxique (tétrachlorure de carbone) ou virale (virus de l'hépatite C).

3.1.5. Evaluation de l'effet hépatoprotecteur *in vivo* de l'extrait aqueux de *D. adscendens* vis-à-vis de l'hépatite induite par le tétrachlorure de carbone sur quelques paramètres de la fonction hépatique

3.1.5.1. Au niveau sérique

3.1.5.1.1. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité des transaminases (ALAT et ASAT)

La figure 34 montre les effets de *D. adscendens* sur l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT) un, quatre et cinq jours après exposition au CCl₄.

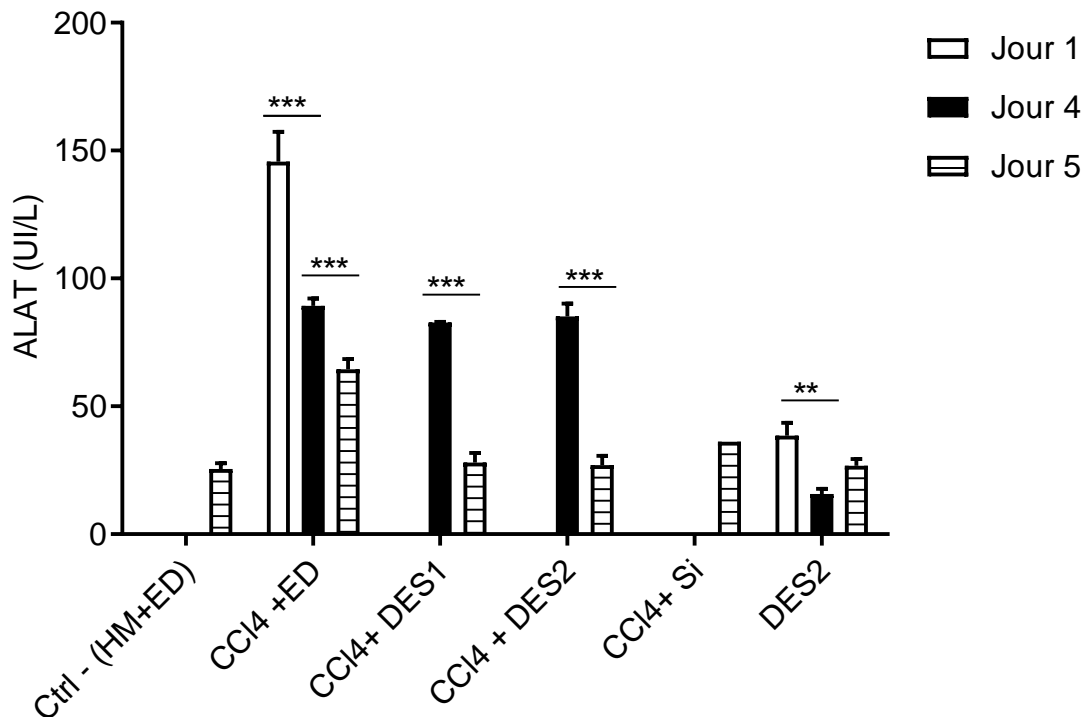


Figure 34: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de l'ALAT un, quatre et cinq jours après administration du CCl₄

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM ; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. ***: différence significative à $p < 0,001$; **: différence significative à $p < 0,01$.

Ctrl-(HM+ED) : rats control normal ayant reçu les véhicule (huile de maïs et eau distillée) ; CCl₄+ED : rats ayant reçus le CCl₄ et l'eau distillée, CCl₄+DES1 : rats ayant reçus le CCl₄ et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; CCl₄+DES2: rats ayant reçus le CCl₄ et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; CCl₄+Si : rats ayant reçus le CCl₄ et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel ; DES2 : rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

Le traitement des animaux au CCl₄ a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'ALAT dans le témoin négatif (CCl₄+ED) comparé au témoin normal (Ctrl-(HM+ED)). Cette augmentation était de l'ordre de 159,56% au jour 5. Toutefois, une baisse jour-dépendante a été notée dans ce groupe (témoin négatif). Par contre l'administration aux groupes intoxiqués au CCl₄ des extraits aqueux aux différentes doses (DES1 et DES2) a

montré une baisse significative ($p < 0,001$) sur cette activité au jour 5, ceci de l'ordre de 56,37 et 58,23% respectivement contre une diminution de 43,94% pour la silymarine. Une diminution significative de cette activité a par ailleurs été observée entre les jours 4 et 5.

La figure 35 montre les effets de *D. adscendens* sur l'activité de l'aspartate aminotransférase (ASAT) un, quatre et cinq jours après exposition au CCl_4 .

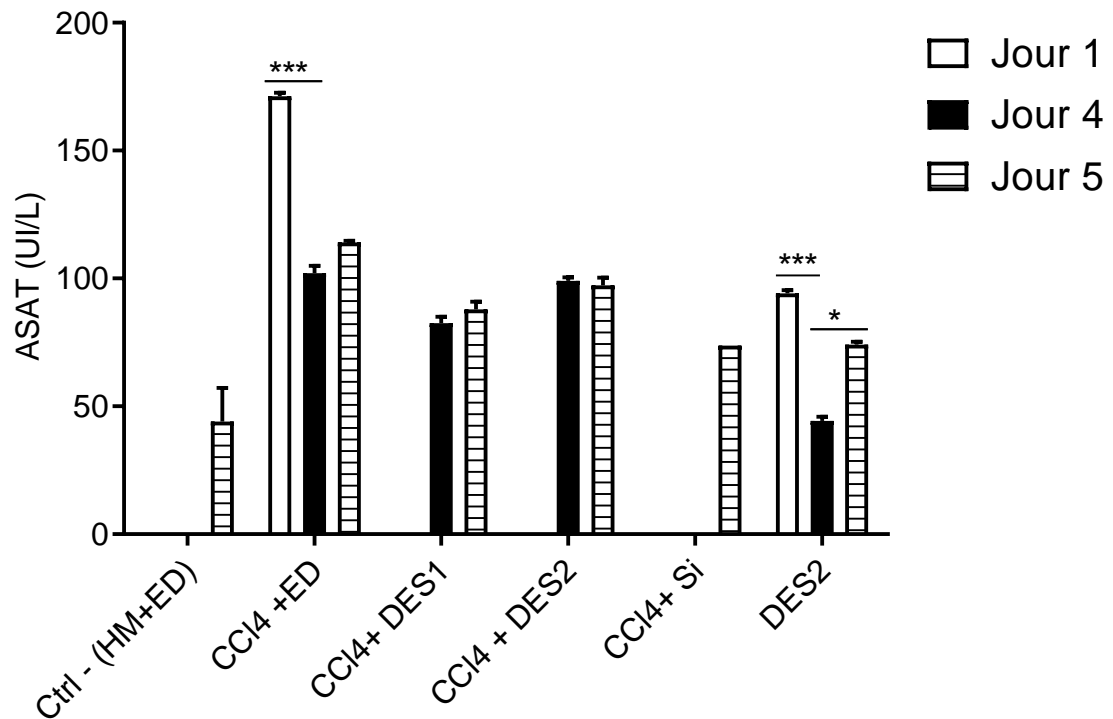


Figure 35: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de l'ASAT un, quatre et cinq jours après administration du CCl_4

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM ; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. *** : différence significative à $p < 0,001$; * : différence significative à $p < 0,05$.

Ctrl-(HM+ED) : rats control normal ayant reçu les véhicule (huile de maïs et eau distillée) ; CCl_4 +ED : rats ayant reçus le CCl_4 et l'eau distillée, CCl_4 +DES1 : rats ayant reçus le CCl_4 et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; CCl_4 +DES2: rats ayant reçus le CCl_4 et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; CCl_4 +Si : rats ayant reçus le CCl_4 et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel ; DES2 : rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

Le traitement des animaux au CCl_4 a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'ASAT dans le témoin négatif (CCl_4 +ED) comparé au témoin normal (Ctrl-(HM+ED)). Toutefois, une baisse jour-dépendante a été notée dans ce groupe (témoin négatif). Par contre l'administration des différentes doses de l'extrait aqueux de *D. adscendens* (DES1 et DES2) n'a pas montré une baisse significative sur cette activité quelque soit le jour traité.

3.1.5.1.2. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)

La figure 36 montre les effets de *D. adscendens* sur l'activité de la PAL un, quatre et cinq jours après exposition au CCl₄.

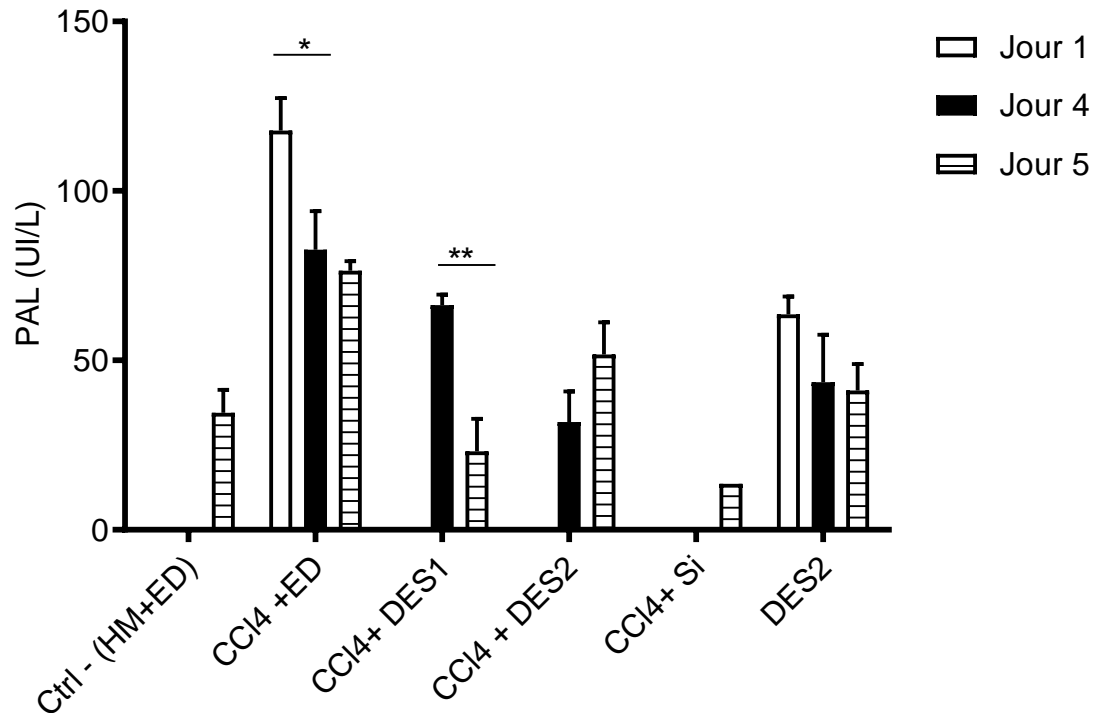


Figure 36: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) un, quatre et cinq jours après administration du CCl₄

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM ; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. **: différence significative à $p < 0,01$; * : différence significative à $p < 0,05$.

Ctrl-(HM+ED) : rats control normal ayant reçu le véhicule (huile de maïs et eau distillée) ; *CCl₄+ED* : rats ayant reçu le CCl₄ et l'eau distillée, *CCl₄+DES1* : rats ayant reçus le CCl₄ et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; *CCl₄+DES2* : rats ayant reçus le CCl₄ et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; *CCl₄+Si* : rats ayant reçus le CCl₄ et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel ; *DES2* : rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

L'administration du CCl₄ a entraîné une augmentation significative ($p < 0,01$) de la PAL dans le témoin négatif (CCl₄+ED) contrairement au témoin normal (Ctrl-(HM+ED)). Toutefois, une baisse significative ($p < 0,05$) de l'activité de la PAL a été notée entre les jours 1 et 5 dans ce groupe d'animaux. L'administration de *D. adscendens* à ces groupes intoxiqués a permis de manière générale de réduire significativement l'activité de cette enzyme. En effet, l'ajout de l'extrait à la dose de 50 mg/kg de poids corporel (DES1) a entraîné une baisse significative ($p < 0,01$) entre les jours 4 et 5 alors avec l'ajout de l'extrait à la dose de 200 mg/kg (DES2),

c'est le contraire qui a été observé. L'activité inhibitrice de la silymarine sur cette activité reste plus prononcée qu'avec nos différentes doses de l'extrait.

3.1.5.1.3. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur le taux malondialdéhyde (MDA)

La figure 37 présente les effets de *D. adscendens* sur le taux de MDA un, quatre et cinq jours après exposition au CCl₄.

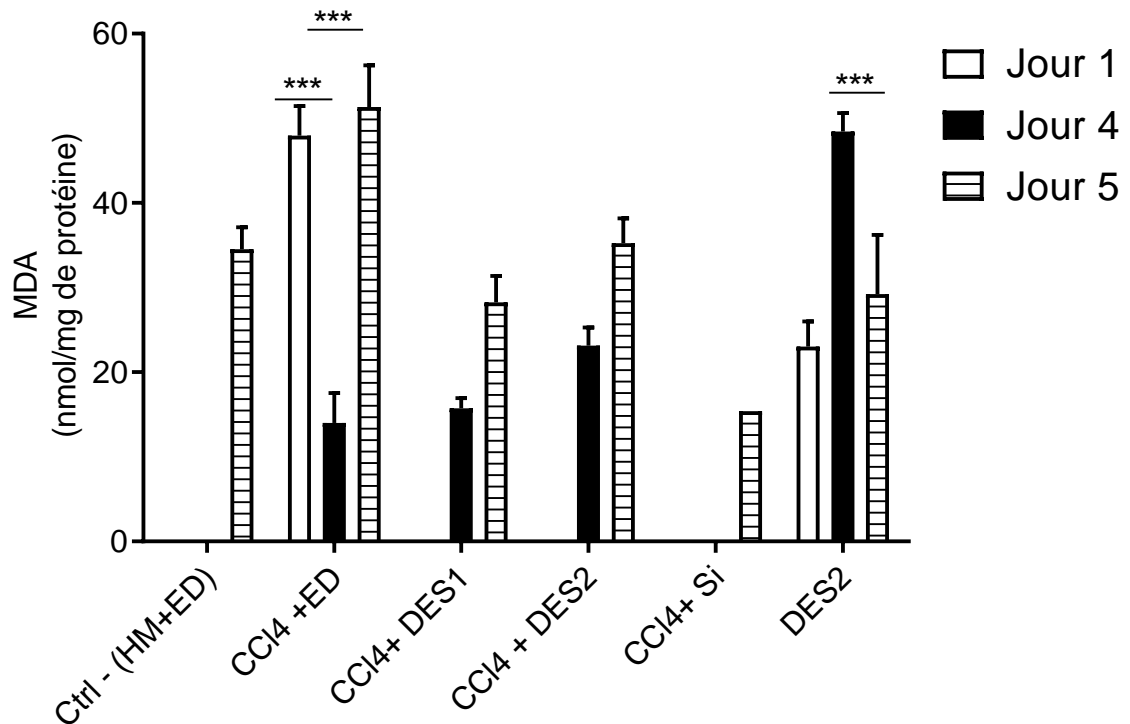


Figure 37: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur le taux de malondialdéhyde un, quatre et cinq jours après administration du CCl₄

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. **: différence significative à $p < 0,01$.

Ctrl-(HM+ED) : rats control normal ayant reçu les véhicule (huile de maïs et eau distillée) ; CCl₄+ED : rats ayant reçus le CCl₄ et l'eau distillée, CCl₄+DES1 : rats ayant reçus le CCl₄ et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; CCl₄+DES2: rats ayant reçus le CCl₄ et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; CCl₄+Si : rats ayant reçus le CCl₄ et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel ; DES2 : rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

Les effets de DES1 et DES2 sur le MDA sérique ne sont réellement appréciable qu'au jour 5 où une diminution significative ($p < 0,001$) a été observée comparativement au groupe CCl₄. En effet, il a été observé par rapport aux rats normaux ayant reçus de l'eau distillée une augmentation significative ($p < 0,001$) du taux de MDA. Cette augmentation était de l'ordre de 72,43 % chez les animaux ayant reçus le CCl₄ et l'eau distillée. L'extrait (DES1) ainsi que la silymarine associée au CCl₄ ont diminué de manière significative ces taux de 61,34% ($p <$

0,01) et de 74,12 ($p < 0,001$) respectivement par rapport aux animaux ayant reçus le CCl_4 et l'eau distillée.

3.1.5.2. Au niveau hépatique

3.1.5.2.1. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

La figure 38 montre les effets de *D. adscendens* sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) un, quatre et cinq jours après exposition au CCl_4 .

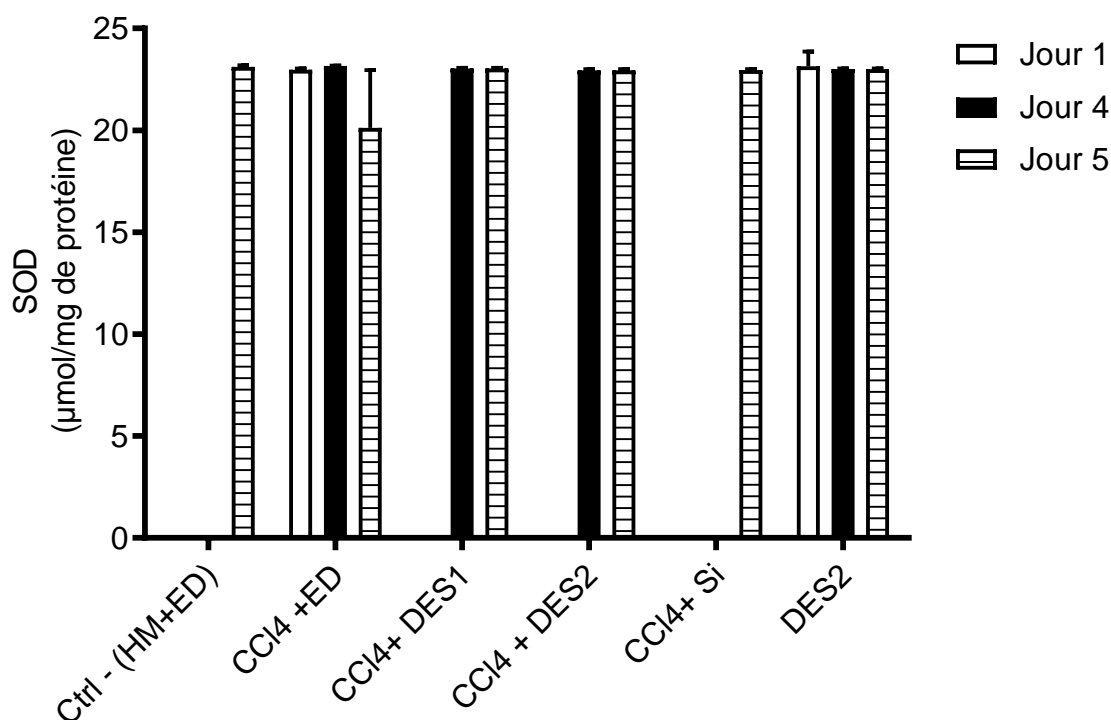


Figure 38: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) un, quatre et cinq jours après administration du CCl_4

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe.

Ctrl-(HM+ED) : rats control normal ayant reçu les véhicule (huile de maïs et eau distillée) ; *CCl₄+ED* : rats ayant reçus le CCl_4 et l'eau distillée, *CCl₄+DES1* : rats ayant reçus le CCl_4 et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; *CCl₄+DES2*: rats ayant reçus le CCl_4 et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; *CCl₄+Si* : rats ayant reçus le CCl_4 et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel ; *DES2* : rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

De manière générale, le CCl_4 n'affecte pas l'activité de la SOD et le traitement par les différentes doses de l'extrait de *D. adscenden* (DES1 et DES2) n'a pas montré une

modification de l'activité de cette enzyme entre les différents groupes d'animaux quelque soit le jour.

3.1.5.2.2. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de la catalase (CAT)

La figure 39 montre les effets de *D. adscendens* sur l'activité de la catalase (CAT) un, quatre et cinq jours après exposition au CCl₄.

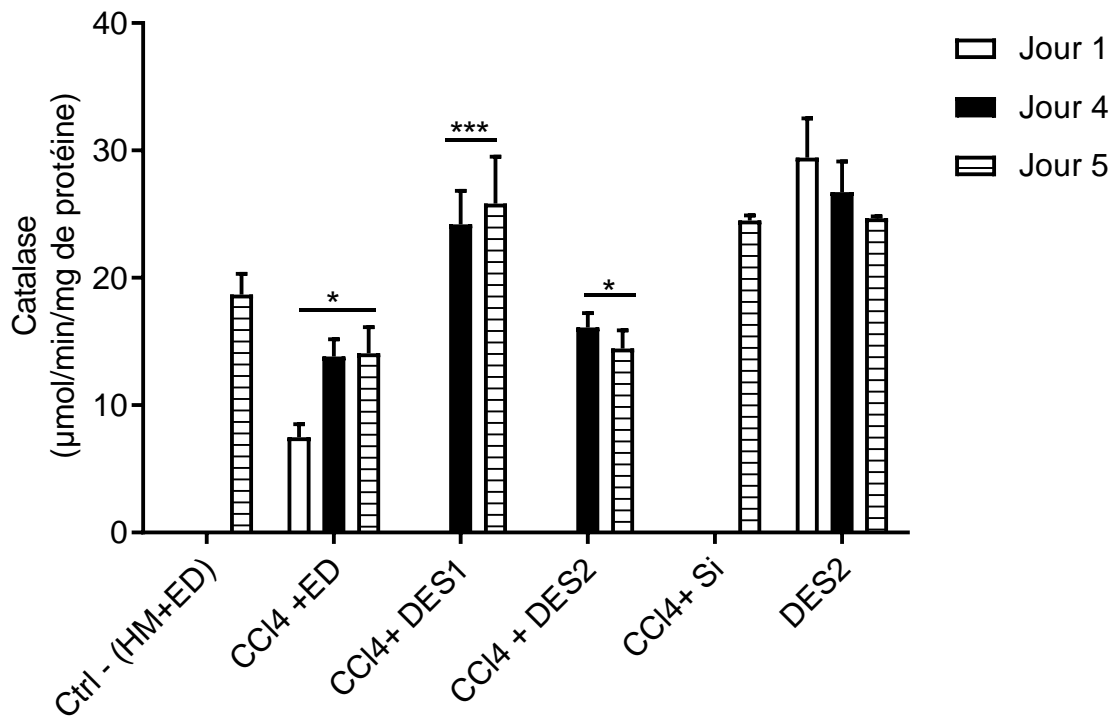


Figure 39: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de la catalase (CAT) un, quatre et cinq jours après administration du CCl₄

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. ***: différence significative à $p < 0,001$. *: différence significative à $p < 0,05$;

Ctrl-(HM+ED) : rats control normal ayant reçu les véhicule (huile de maïs et eau distillée) ; CCl₄+ED : rats ayant reçus le CCl₄ et l'eau distillée, CCl₄+DES1 : rats ayant reçus le CCl₄ et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; CCl₄+DES2: rats ayant reçus le CCl₄ et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; CCl₄+Si : rats ayant reçus le CCl₄ et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel ; DES2 : rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

De manière générale, l'activité de la catalase ne varie pas significativement entre les jours 1 à 5 dans les différents groupes d'animaux. Par contre, elle baisse significativement dans le témoin négatif (CCl₄ + ED) ($p < 0,05$) comparativement au témoin normal (Ctrl-

(HM+ED)). Le traitement par DES1 a permis d'augmenter significativement ($p < 0.001$) cette activité comparativement au témoin négatif.

3.1.5.2.3. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur le taux de glutathion (GSH)

La figure 40 montre les effets de *D. adscendens* sur le taux de glutathion un, quatre et cinq jours après exposition au CCl_4 .

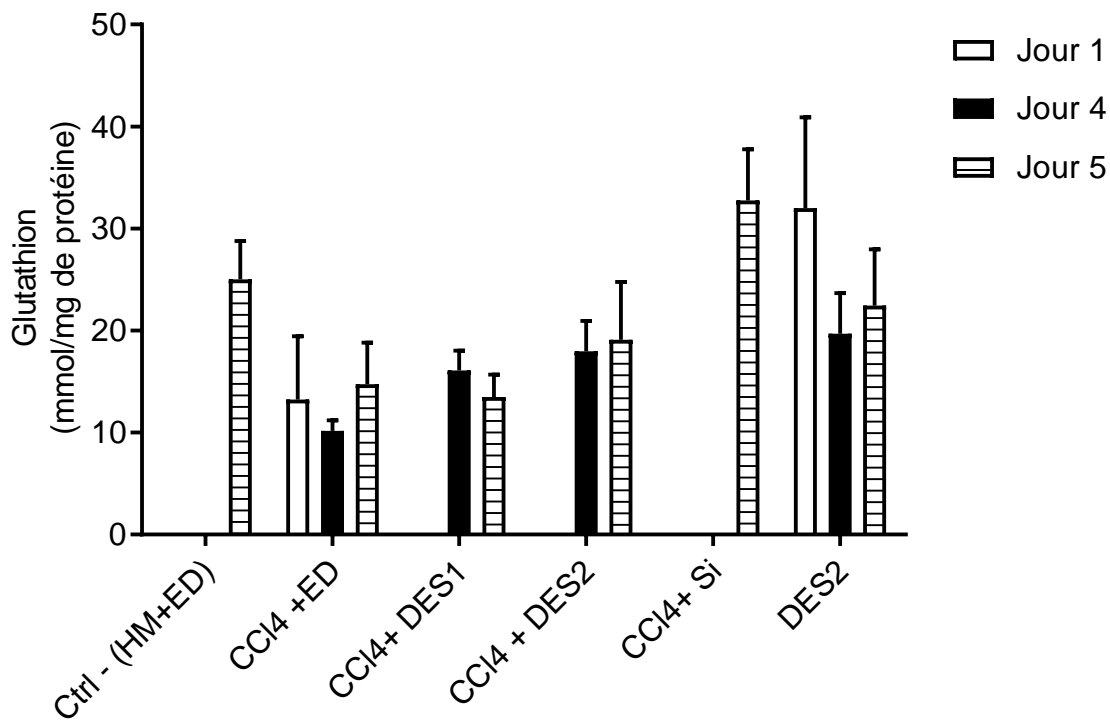


Figure 40: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur le taux de glutathion (GSH) un, quatre et cinq jours après administration du CCl_4

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe.

Ctrl-(HM+ED) : rats control normal ayant reçu les véhicule (huile de maïs et eau distillée); *CCl₄+ED* : rats ayant reçus le CCl_4 et l'eau distillée, *CCl₄+DES1* : rats ayant reçus le CCl_4 et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel; *CCl₄+DES2*: rats ayant reçus le CCl_4 et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel; *CCl₄+Si* : rats ayant reçus le CCl_4 et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel; *DES2* : rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

En présence du CCl_4 , les niveaux de GSH hépatiques chutent de manière non significative comparativement au témoin normal. Contrairement à DES2, DES1 a entraîné une augmentation non significative du taux de GSH dans les groupes intoxiqués au

paracétamol, mais cette augmentation reste faible comparée à celle de la silymarine. De manière générale, on ne note pas une variation significative des niveaux de GSH entre les jours 1 à 5 dans les différents groupes d'animaux.

3.1.5.2.4. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur le taux de malonedialdéhyde (MDA) hépatique

La figure 41 montre les effets de *D. adscendens* sur le taux de malonedialdéhyde (MDA) un, quatre et cinq jours après exposition au CCl₄.

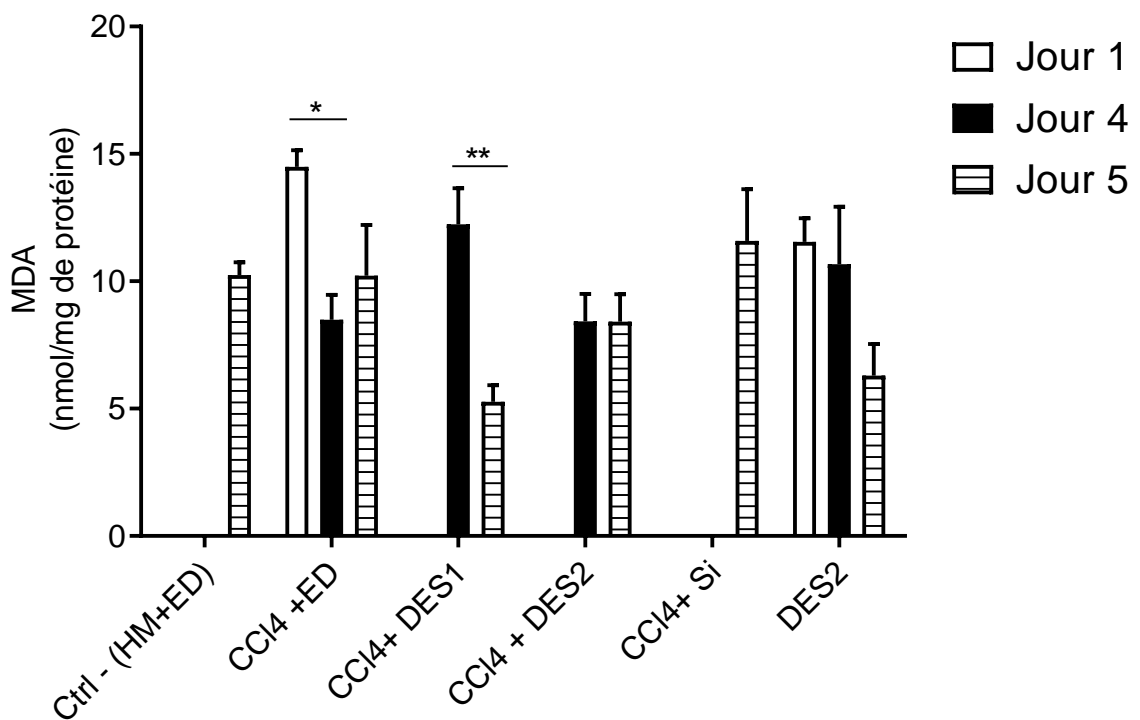


Figure 41: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur le taux de malonedialdéhyde (MDA) un, quatre et cinq jours après administration du CCl₄

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. **: différence significative à $p < 0,01$; *: différence significative à $p < 0,05$;

Ctrl-(HM+ED): rats control normal ayant reçu les véhicule (huile de maïs et eau distillée); *CCl₄+ED*: rats ayant reçus le CCl₄ et l'eau distillée, *CCl₄+DES1*: rats ayant reçus le CCl₄ et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel; *CCl₄+DES2*: rats ayant reçus le CCl₄ et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel; *CCl₄+Si*: rats ayant reçus le CCl₄ et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel; *DES2*: rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

L'effet de *D. adscendens* sur la diminution des niveaux de MDA n'est vraiment perceptible qu'au jour 5, avec DES1 (CCl₄ + DES1) comparativement au témoin CCl₄(CCl₄ + ED), le même jour. Par ailleurs, DES1 a montré une baisse significative ($p < 0,01$) des taux de

MDA entre les jours 4 et 5 contrairement à DES2 où aucune variation n'a été notée entre ces différents jours. De manière étonnante, l'administration du CCl_4 a entraîné une baisse significative des taux de MDA entre les jours 1 et 4.

3.1.6. Evaluation de l'effet hépatoprotecteur *in vivo* de l'extrait aqueux de *D. adscendens* vis-à-vis de l'hépatite induite par le paracétamol sur quelques paramètres de la fonction hépatique

3.1.6.1. Au niveau sérique

3.1.6.1.1. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité des transaminases (ALAT et ASAT)

La figure 42 montre les effets de *D. adscendens* sur l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT) un, quatre et cinq jours après exposition au paracétamol.

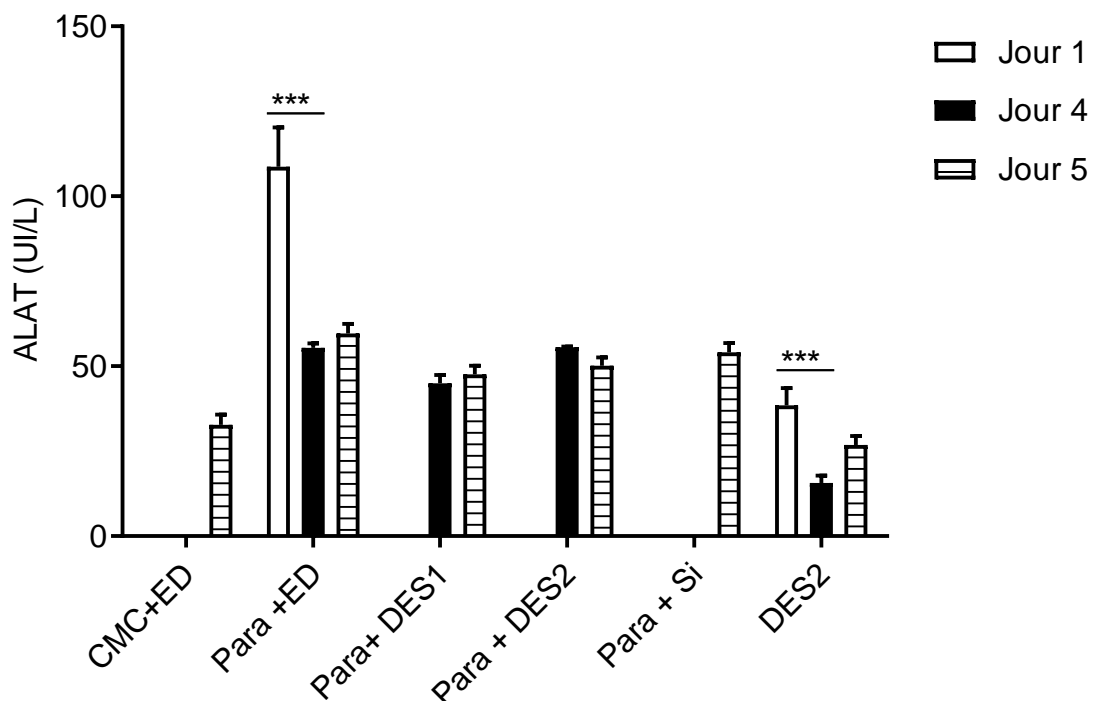


Figure 42: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de l'ALAT un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. ***: différence significative à $p < 0,001$; **: différence significative à $p < 0,01$:

Ctrl-(CMC+ED): rats control normal ayant reçu les véhicule (carboxyméthyl cellulose et eau distillée); Para+ED: rats ayant reçus le Para et l'eau distillée, Para+DES1: rats ayant reçus le para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel; Para+DES2: rats ayant reçus le Para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel; Para+Si: rats ayant reçus le Para et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel; DES2: rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

Le traitement des animaux au paracétamol a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'ALAT dans le témoin négatif (Para+ED) comparé au témoin normal (Ctrl-(CMC+ED)). Cette augmentation est de l'ordre de 132,81% au jour 5. Toutefois, une baisse jour-dépendante a été notée dans ce groupe (témoin négatif) entre les jours 1 et 5. Par contre l'administration aux groupes intoxiqués au paracétamol des extraits aqueux aux différentes doses (DES1 et DES2) n'a pas montré une baisse significative sur cette activité quelque soit le jour traité comparativement au témoin négatif.

La figure 43 montre les effets de *D. adscendens* sur l'activité de l'aspartate aminotransférase (ASAT) un, quatre et cinq jours après exposition au paracétamol.

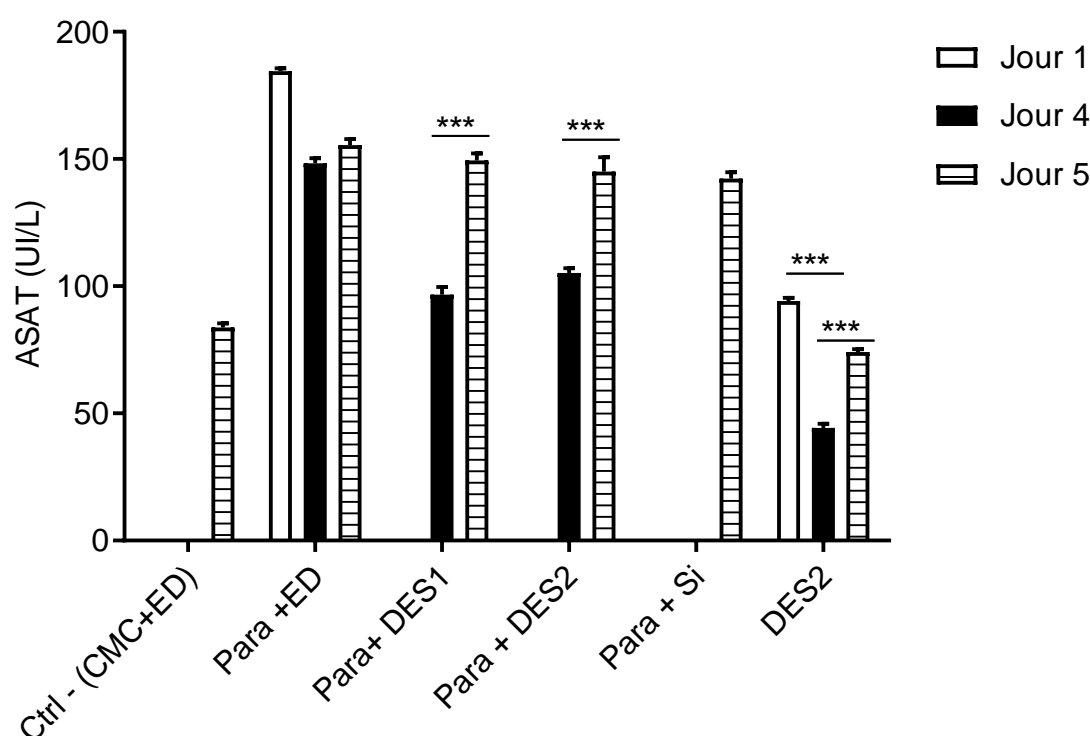


Figure 43: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de l'ASAT un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. ***: différence significative à $p < 0,001$.

Ctrl-(CMC+ED): rats control normal ayant reçu le véhicule (carboxyméthyl cellulose et eau distillée); Para+ED: rats ayant reçu le Para et l'eau distillée, Para+DES1: rats ayant reçu le para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel; Para+DES2: rats ayant reçu le Para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel; Para+Si: rats ayant reçu le Para et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel; DES2: rats ayant reçu l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

Le traitement des animaux au paracétamol a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'ASAT dans le témoin négatif négatif (Para+ED) comparé au témoin normal

(Ctrl-(CMC+ED)). Toutefois, une baisse non significative a été notée dans ce groupe entre les jours 4 et 5. Par contre l'administration des différentes doses de l'extrait aqueux de *D. adscendens* (DES1 et DES2) a montré une baisse significative sur cette activité au jour 4 mais pas au jour 5.

3.1.6.1.2. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)

La figure 44 montre les effets de *D. adscendens* sur l'activité de la PAL un, quatre et cinq jours après exposition au paracétamol.

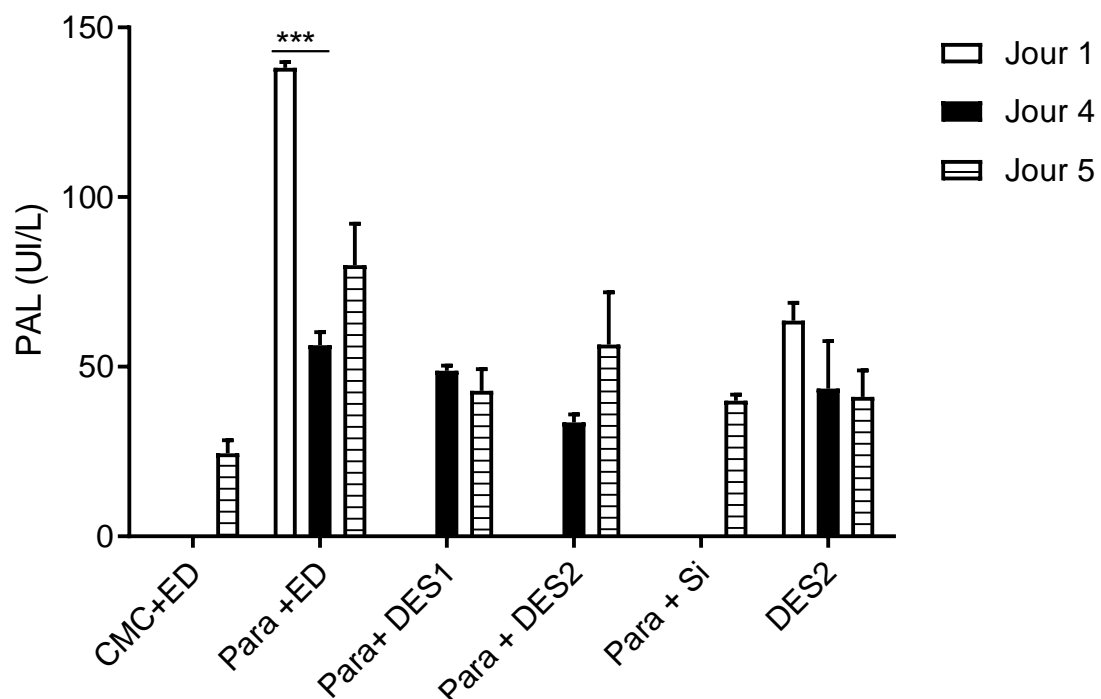


Figure 44: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. ***: différence significative à $p < 0,001$.

Ctrl-(CMC+ED): rats control normal ayant reçu les véhicule (carboxyméthyl cellulose et eau distillée); Para+ED: rats ayant reçus le Para et l'eau distillée, Para+DES1: rats ayant reçus le para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel; Para+DES2: rats ayant reçus le Para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel; Para+Si: rats ayant reçus le Para et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel; DES2: rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

L'administration du paracétamol a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'activité de la PAL dans le témoin négatif (Para+ED) contrairement au témoin normal (Ctrl-(CMC+ED)). Toutefois, une baisse significative de l'activité de la PAL a été notée entre les jours 1, 4 et 5 dans ce groupe d'animaux (témoin négatif). L'administration de *D. adscendens* à ces groupes intoxiqués a permis de réduire significativement de manière générale l'activité de

cette enzyme comparée aux rats traités uniquement au Paracétamol (Para+ED). Avec les deux doses de l'extrait (DES1 et DES2), aucune variation significative n'a été notée entre les jours 4 et 5. L'activité inhibitrice de la silymarine sur cette activité reste plus prononcée qu'avec les différentes doses de l'extrait.

3.1.6.1.3. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur le taux malondialdéhyde (MDA)

La figure 45 présente les effets de *D. adscendens* sur le taux de MDA un, quatre et cinq jours après exposition au paracétamol.

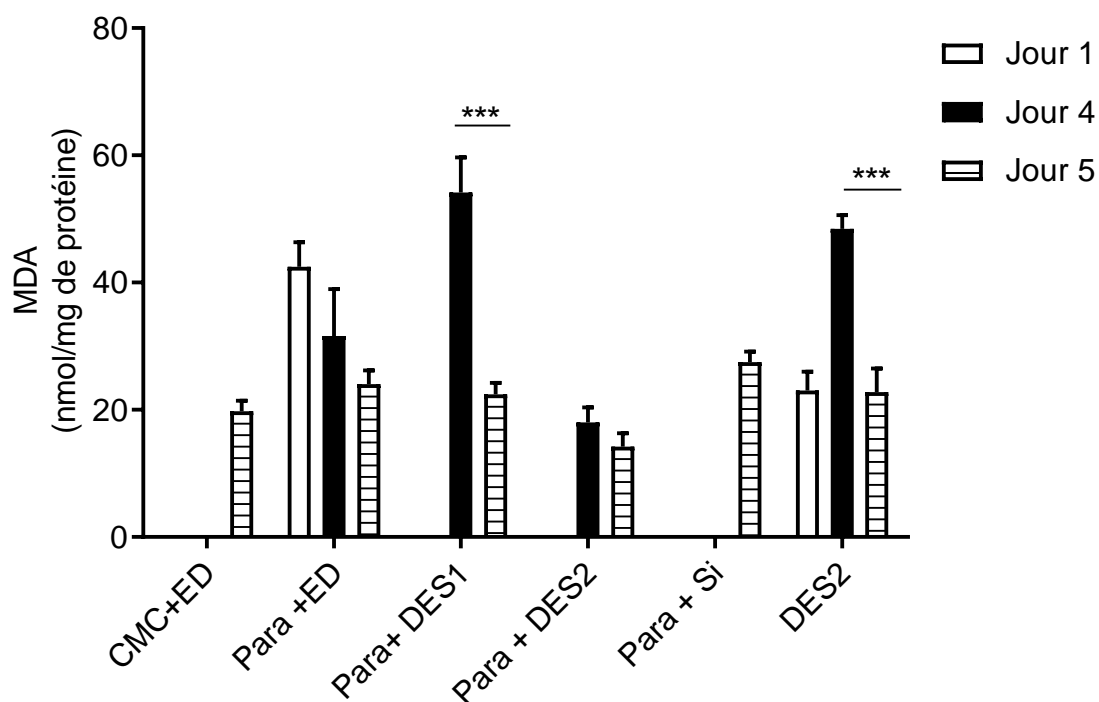


Figure 45: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur le taux de malondialdéhyde un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. ***: différence significative à $p < 0,001$.

Ctrl-(CMC+ED) : rats control normal ayant reçu les véhicule (carboxyméthyl cellulose et eau distillée); Para+ED : rats ayant reçus le Para et l'eau distillée, Para+DES1 : rats ayant reçus le para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel; Para+DES2: rats ayant reçus le Para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel; Para+Si : rats ayant reçus le Para et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel; DES2 : rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

Le traitement des animaux au paracétamol a entraîné une augmentation non significative du MDA dans le témoin négatif (Para+ED) comparé au témoin normal (Ctrl-(CMC+ED)). Toutefois, une baisse jour-dépendante a été notée dans ce groupe (témoin négatif). Par ailleurs, l'administration de l'extrait de *D. adscendens* à la dose de 50 mg/kg de poids corporel (DES2)aux rats intoxiqués a montré une baisse significative ($p < 0,001$) du taux de MDA au 5 contrairement à l'administration de l'extrait de *D. adscendens* à la dose de 200

mg/kg de poids corporel (DES2) qui n'a montré variation de taux de MDA lorsqu'on passe du jour 4 au jour 5.

3.1.6.2. Au niveau hépatique

3.1.4.2.1. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

La figure 46 montre les effets de *D. adscendens* sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) un, quatre et cinq jours après exposition au paracétamol.

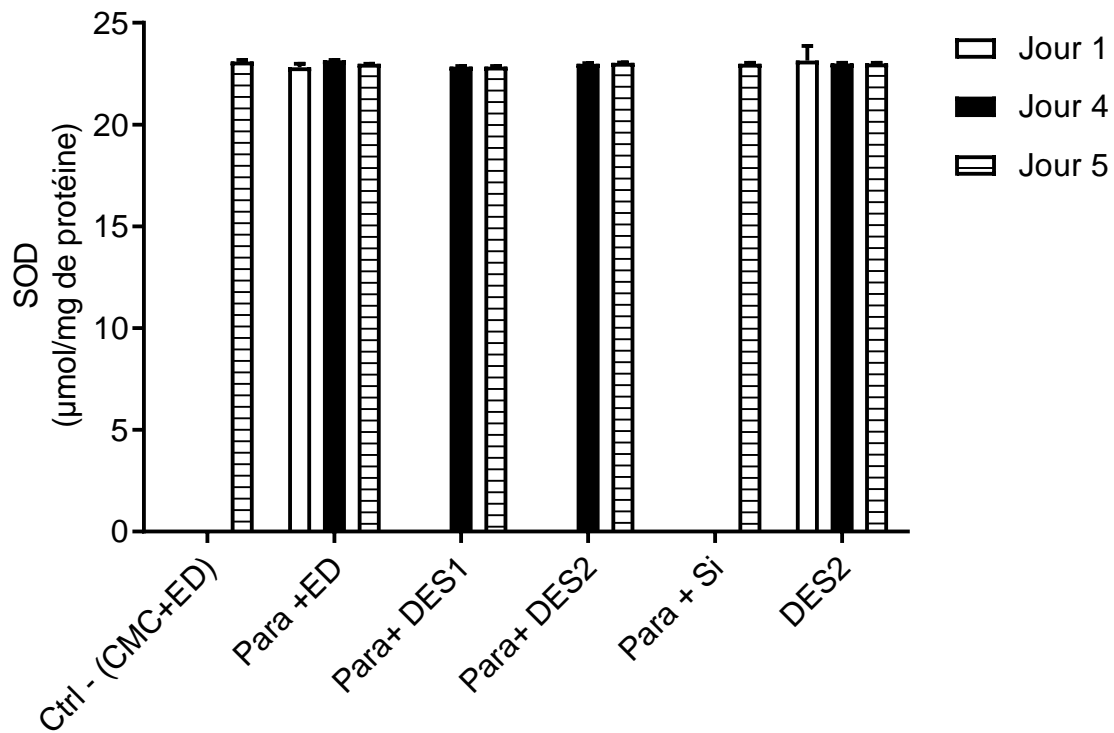


Figure 46: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) un, quatre et cinq jours après administration du CCl₄

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe.

Ctrl-(HM+ED) : rats control normal ayant reçu les véhicule (huile de maïs et eau distillée) ; CCl₄+ED : rats ayant reçus le CCl₄ et l'eau distillée, CCl₄+DES1 : rats ayant reçus le CCl₄ et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; CCl₄+DES2: rats ayant reçus le CCl₄ et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; CCl₄+Si : rats ayant reçus le CCl₄ et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel ; DES2 : rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

De manière générale, le paracétamol n'affecte pas l'activité de la SOD et le traitement par les différentes doses de l'extrait de *D. adscenden* (DES1 et DES2) n'a pas montré une modification de l'activité de cette enzyme entre les différents groupes d'animaux quelque soit le jour.

3.1.6.2.2. Effet de l'extrait de *D. adscenden* sur l'activité de la catalase (CAT)

La figure 47 montre les effets de *D. adscenden* sur l'activité de la catalase (CAT) un, quatre et cinq jours après exposition au paracétamol.

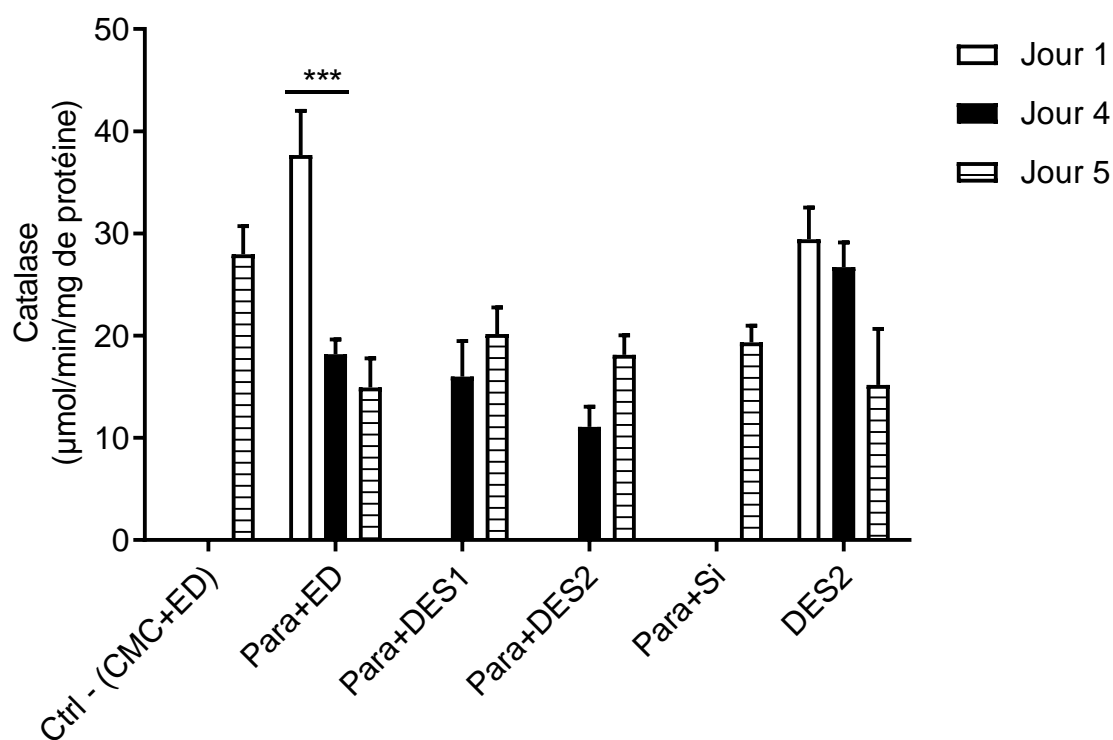


Figure 47: Effets de l'extrait de *D. adscenden* sur l'activité de la catalase (CAT) un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. ***: différence significative à $p < 0,001$.

Ctrl-(CMC+ED) : rats control normal ayant reçu les véhicule (carboxyméthyl cellulose et eau distillée) ; Para+ED : rats ayant reçus le Para et l'eau distillée, Para+DES1 : rats ayant reçus le para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; Para+DES2 : rats ayant reçus le Para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; Para+Si : rats ayant reçus le Para et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel ; DES2 : rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

L'administration du paracétamol a entraîné une baisse significative ($p < 0,001$) de l'activité de la catalase dans le témoin négatif (Para+ED) au jour 5 comparativement au témoin normal (Ctrl-(CMC+ED)). L'administration de l'extrait de *D. adscendens* aux doses respectives de 50 mg/kg de poids corporel (DES1) 200 mg/kg de poids corporel (DES2) aux rats intoxiqués a montré une baisse non significative de cette activité de la catalase au jour 4 et une hausse non significative de cette activité au jour 5 comparativement au groupe témoin négatif (Para+ED).

3.1.6.2.3. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur le taux de glutathion (GSH)

La figure 48 montre les effets de *D. adscendens* sur le taux de glutathion un, quatre et cinq jours après exposition au paracétamol.

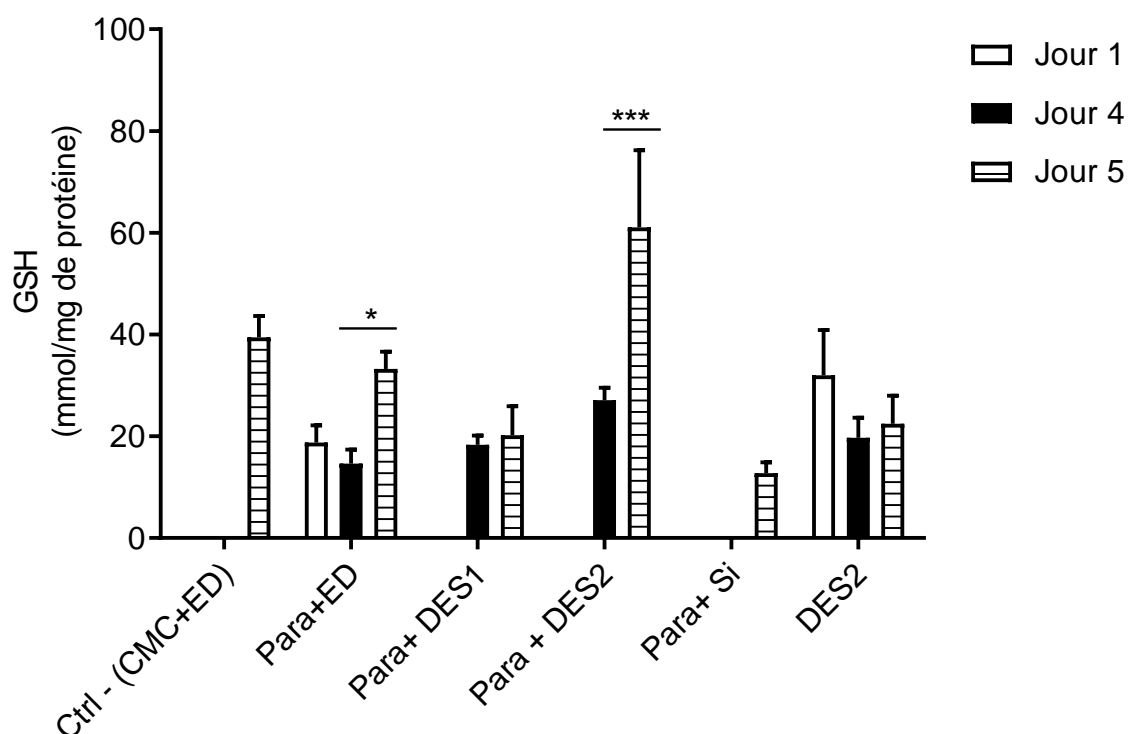


Figure 48: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur le taux de glutathion (GSH) un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. ***: différence significative à $p < 0,001$; *: différence significative à $p < 0,05$.

Ctrl-(CMC+ED) : rats control normal ayant reçu les véhicule (carboxyméthyl cellulose et eau distillée) ; Para+ED : rats ayant reçus le Para et l'eau distillée, Para+DES1 : rats ayant reçus le para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; Para+DES2: rats ayant reçus le Para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; Para+Si : rats ayant reçus le Para et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel ; DES2 : rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

En présence de paracétamol, les niveaux de GSH hépatiques chutent dans le groupe témoin négatif (Para+ED) de manière non significative et comparativement au témoin normal (Ctrl-(CMC+ED)) quelque soit le jour considéré. Seulement une augmentation significative ($p < 0,05$) est enregistrée au jour 5 dans le groupe témoin négatif (Para+ED). Contrairement au groupe Para+DES, l'administration de l'extrait à la dose de 200 mg/kg de poids corporel (DES2) a entraîné une augmentation du taux de GSH qui devient significative ($p < 0,001$) au jour 5.

3.1.6.2.4. Effet de l'extrait de *D. adscendens* sur le taux malondialdéhyde (MDA)

La figure 49 présente les effets de *D. adscendens* sur le taux de MDA un, quatre et cinq jours après exposition au paracétamol.

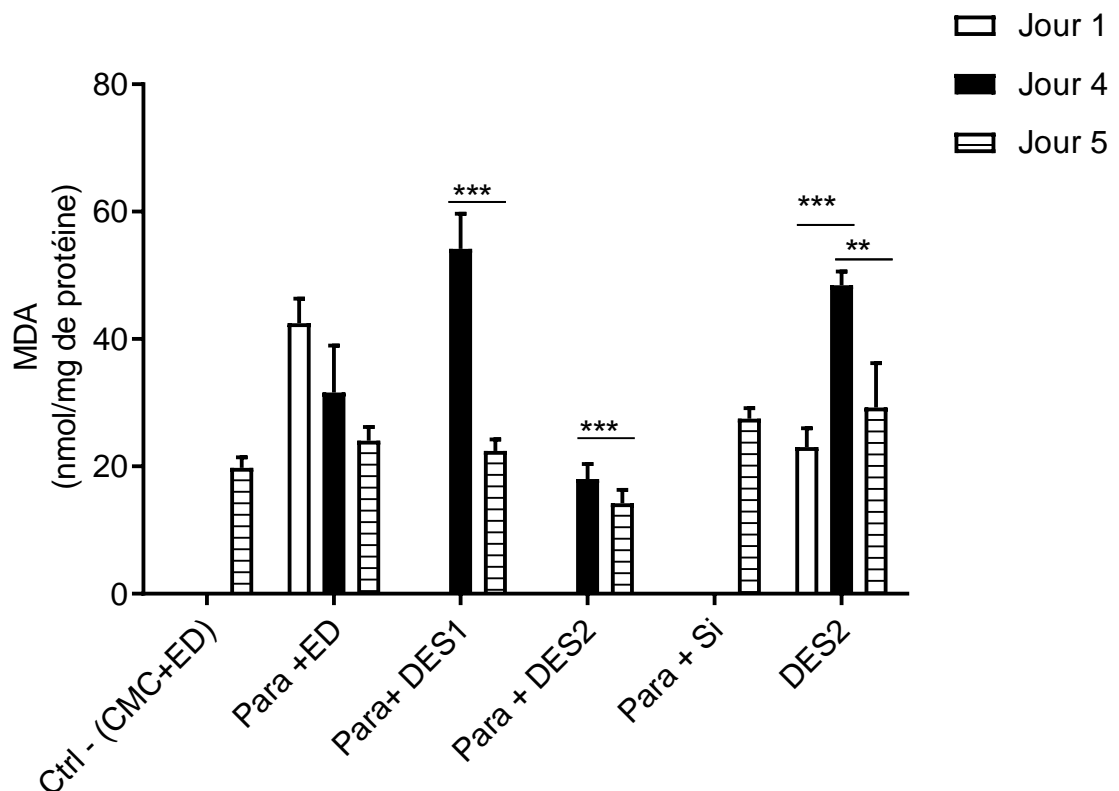


Figure 49: Effets de l'extrait de *D. adscendens* sur le taux de malondialdéhyde un, quatre et cinq jours après administration du paracétamol

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM; $n = 4$; Les comparaisons ont été faites entre les différents jours pour un même groupe. ***: différence significative à $p < 0,001$; **: différence significative à $p < 0,01$.

Ctrl-(CMC+ED) : rats control normal ayant reçu le véhicule (carboxyméthyl cellulose et eau distillée) ; *Para+ED* : rats ayant reçus le Para et l'eau distillée, *Para+DES1* : rats ayant reçus le para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; *Para+DES2* : rats ayant reçus le Para et l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel ; *Para+Si* : rats ayant reçus le Para et la silymarine à la dose 100 mg/kg de poids corporel ; *DES2* : rats ayant reçus l'extrait à la dose 200 mg/kg de poids corporel.

Le traitement des animaux au paracétamol a entraîné une augmentation non significative du MDA dans le témoin négatif (*Para+ED*) comparé au témoin normal (*Ctrl-(CMC+ED)*). Toutefois, une baisse jour-dépendante a été notée dans ce groupe. Par ailleurs, l'administration de l'extrait de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel (*DES2*) aux rats intoxiqués a montré une baisse significative ($p < 0,001$) sur cette activité aux jours 4 et 5 contrairement à l'administration de l'extrait de *D. adscendens* à la dose de 50 mg/kg de poids corporel (*DES1*) qui a montré d'activité intéressante ($p < 0,001$) qu'au jour 4.

3.1.7. Effets de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur l'expression des protéines du processus de différenciation et/ou de maturation hépatiques des rats intoxiqués au CCl_4 ou au paracétamol: cas de la protéine SOX 17 (SOX17)

Les gènes Sox comprennent une famille de gènes qui sont liés au gène SRY de détermination du sexe des mammifères. Ces gènes contiennent de manière similaire des séquences qui codent pour le domaine de la boîte HMG, qui est responsable de l'activité de liaison à l'ADN spécifique à la séquence. Les gènes Sox codent pour des régulateurs transcriptionnels putatifs impliqués dans la décision du destin des cellules au cours du développement et dans le contrôle de divers processus de développement. Actuellement, 30 gènes Sox ont été identifiés.

Sox 17 intervient à la fois dans la différenciation et la maturation hépatique. En effet, Sox17 est un composant clé de la formation d'endoderme lors de la gastrulation des vertébrés.

Au stade de l'endoderme définitif, les cellules expriment Sox17 qui est nécessaire à la formation du foie chez plusieurs espèces.

La figure 50 illustre au jour 5 les effets de l'administration de l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au tétrachlorure de carbone (CCl_4).

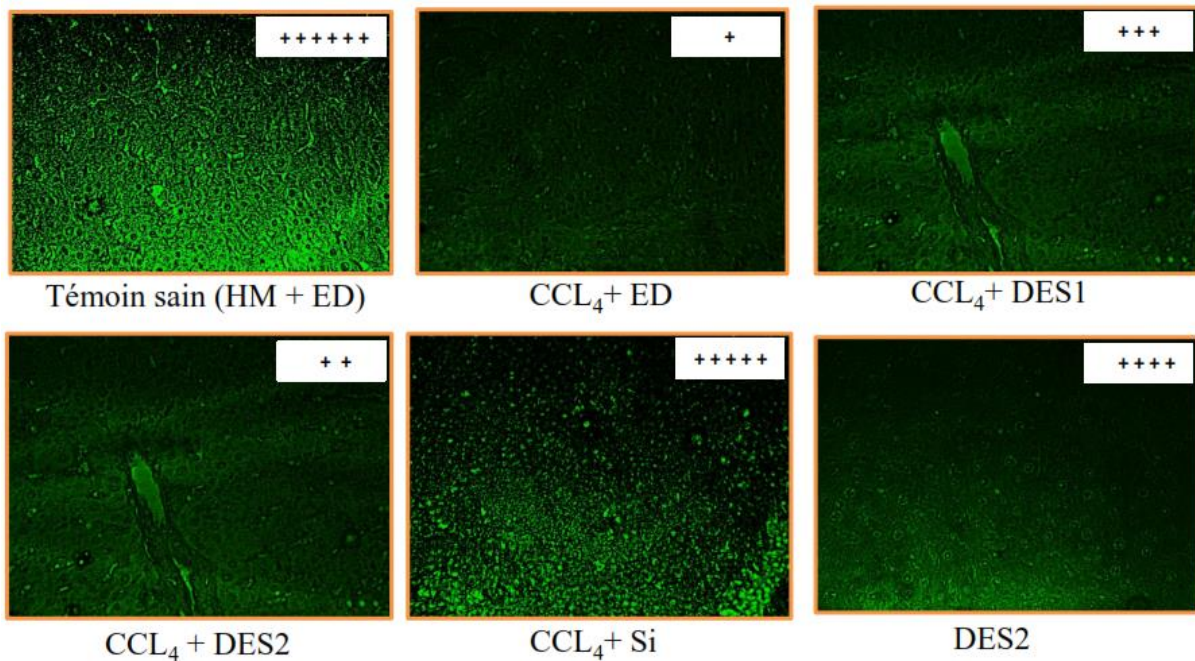


Figure 50: Effets de l'administration de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au tétrachlorure de carbone (CCl₄) au jour 5

Les signes + matérialisent l'intensité visuelle de la fluorescence.

*Témoin sain = lot des animaux ayant reçu l'huile de maïs (7 mL/kg) et de l'eau distillée (10 mL/kg); CCl₄ + ED = lot des animaux ayant reçu le CCl₄ et de l'eau distillée ; CCl₄ + DES1, CCl₄ + DES2 = lots des animaux ayant reçu le CCl₄ et l'extrait aqueux de *D. adscendens* aux doses respectives de 50 mg/kg et 200 mg/kg ; CCl₄ + Si = lot des animaux ayant reçu le CCl₄ et la silymarine à la dose de 100 mg/kg ; DES2 = lot des animaux ayant reçu l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg.*

Le CCl₄ est administré à la dose de 0,3 mL/kg de poids corporel.

L'administration intrapéritonéale du CCl₄ pendant cinq jours a réduit l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats ayant reçu de l'eau distillée par comparaison au lot témoin n'ayant pas reçu du CCl₄. Cette diminution s'observe sur les microphotographies par une fluorescence plus faible chez le lot CCl₄+ED par comparaison au lot témoin sain. Le traitement concomitant des animaux avec le CCl₄ et l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* ou la silymarine s'est traduit par une fluorescence plus accrue par rapport au témoin non traité, ce qui traduirait ainsi une augmentation de l'expression du gène Sox 17, composant clé de la formation d'endoderme lors de la gastrulation des vertébrés, étape qui précède le processus de différenciation et de maturation hépatique. L'administration exclusive de l'extrait de *Desmodium adscendens* aux animaux sains n'a pas induit une fluorescence accentuée par rapport au témoin non traité.

La figure 51 illustre au jour 5 les effets de l'administration de l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au paracétamol.

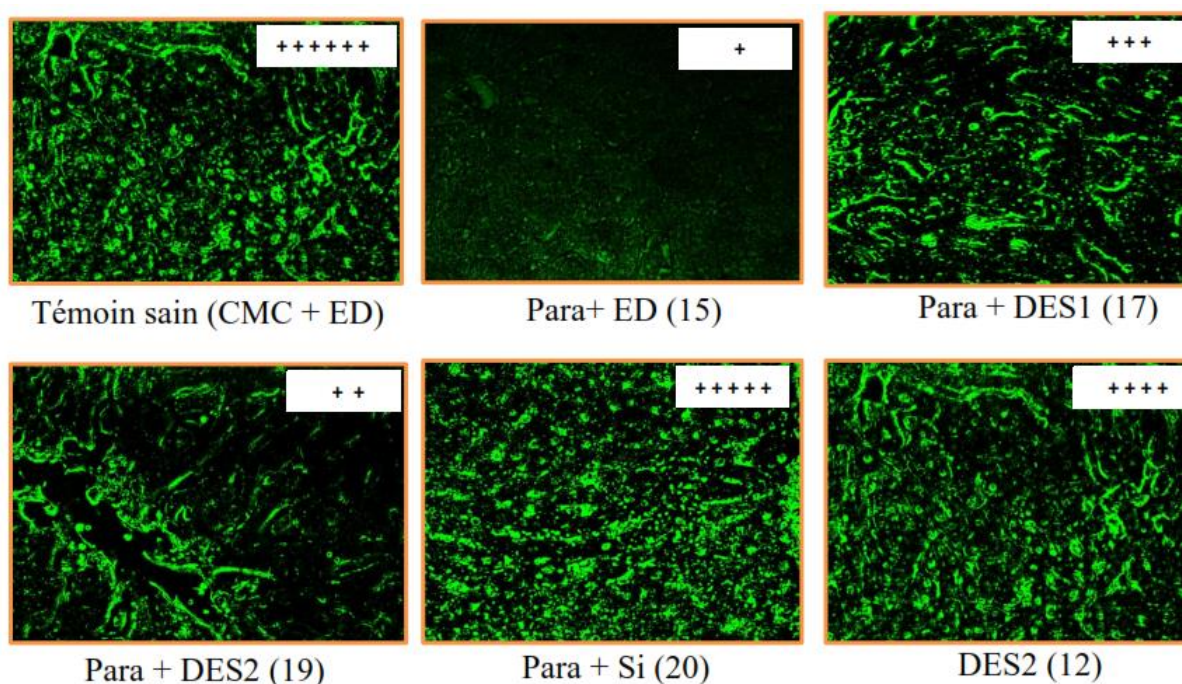


Figure 51: Effets de l'administration de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au paracétamol au jour 5.

Les signes + matérialisent l'intensité visuelle de la fluorescence.

*Témoin sain = lot des animaux ayant reçu le carboxyméthylcellulose (CMC) (1%) et de l'eau distillée (10 mL/kg); Para + ED = lot des animaux ayant reçu le paracétamol et de l'eau distillée ; Para + DES1, Para + DES2 = lots des animaux ayant reçu le paracétamol et l'extrait aqueux de *D. adscendens* aux doses respectives de 50 mg/kg et 200 mg/kg ; Para + Si = lot des animaux ayant reçu le paracétamol et la silymarine à la dose de 100 mg/kg ; DES2 = lot des animaux ayant reçu l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg.*

Le paracétamol est administré à la dose de 500 mg/kg de poids corporel.

Tout comme observé précédemment, l'administration orale du paracétamol pendant cinq jours a réduit l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats ayant reçu de du paracétamol et de l'eau distillée par comparaison au lot témoin n'ayant pas reçu du paracétamol. Cette diminution s'observe sur les microphotographies par une fluorescence plus faible chez le lot Para + ED par comparaison au lot témoin sain. Le traitement concomitant des animaux avec le paracétamol et l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* ou la silymarine s'est traduit par une fluorescence plus importante par rapport au témoin non traité ; indiquant ainsi une augmentation de l'expression du gène Sox 17.

L'administration exclusive de l'extrait de *Desmodium adscendens* aux animaux sains présente ici une induction de Sox 17 matérialisée par une fluorescence accentuée par rapport au témoin non traité.

3.1.8. Effets de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur l'expression des protéines du processus de différenciation et/ou de maturation hépatique via l'expression en fonction du temps du facteur Sox 17 par des rats intoxiqués au CCl₄

L'évolution en fonction du temps de l'expression de la protéine Sox 17 dans le foie des rats au cours de cette expérimentation a été déterminée à travers la quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue sur les microphotographies de la figure 50.

Plus l'intensité de fluorescence cellulaire est grande, plus grande est l'expression de la protéine Sox17.

La figure 52 illustre au jour 4, les intensités des fluorescences cellulaires résultantes des microphotographies obtenues des effets de l'administration quotidienne de l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* sur l'expression de la protéine Sox 17 dans le foie des rats préalablement intoxiqués au tétrachlorure de carbone (CCl₄).

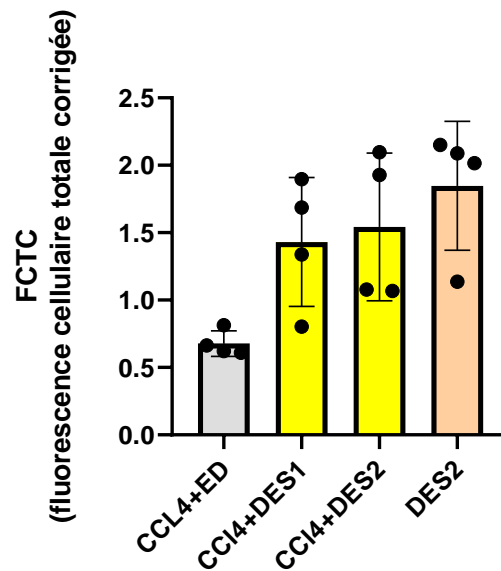


Figure 52: Intensités de la fluorescence cellulaire lors de l'étude de l'effet de l'administration de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au tétrachlorure de carbone (CCl₄) au jour 4

Les histogrammes représentent les moyennes ± ESM des intensités de fluorescence cellulaires totales corrigées.

CCL₄+ED = lots des animaux ayant reçu une dose unique de CCl₄ et de l'eau distillée quotidiennement et sacrifiés au jour 4; *CCL₄+DES1* = lots des animaux ayant reçu une dose unique de CCl₄ et quotidiennement l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 50 mg/kg de poids corporel, puis sacrifiés le jour 4; *CCL₄+DES2* = lots des animaux ayant reçu une dose unique de CCl₄ et quotidiennement l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel, puis sacrifiés le jour 4; *DES2* = lots des animaux ayant reçu quotidiennement de l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel et sacrifiés le jour 4.

Le traitement quotidien avec l'extrait de *D. adscendens* aux doses respectives de 50 et 200 mg/kg (DES1, DES2) de poids corporel chez les animaux préalablement intoxiqués

entraîne au jour 4 une augmentation de l'expression de Sox 17. Cette même augmentation d'intensité de fluorescence (augmentation de l'expression de Sox 17) est notée chez les animaux recevant quotidiennement de l'extrait de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel (DES2).

La figure 53 illustre au jour 5, les intensités des fluorescences cellulaires résultantes des microphotographies obtenues des effets de l'administration quotidienne de l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* sur l'expression de la protéine Sox 17 dans le foie des rats préalablement intoxiqués au tétrachlorure de carbone (CCl₄).

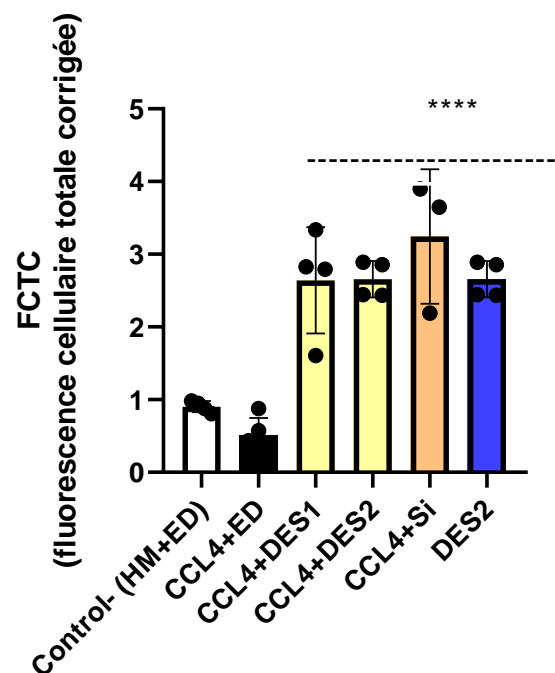


Figure 53: Intensités de la fluorescence cellulaire lors de l'étude de l'effet de l'administration de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au tétrachlorure de carbone (CCl₄) au jour 5

Les histogrammes représentent les moyennes ± ESM des intensités de fluorescence cellulaires totales corrigées.

Control-(HM+ED) = lots des animaux ayant reçu une dose unique de véhicule du CCl₄ (huile de maïs) et de l'eau distillée quotidiennement et sacrifiés au jour 5; CCL₄+ED = lots des animaux ayant reçu une dose unique de CCl₄ et de l'eau distillée quotidiennement et sacrifiés au jour 5; CCL₄+DES1 = lots des animaux ayant reçu une dose unique de CCl₄ et quotidiennement l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 50 mg/kg de poids corporel, puis sacrifiés le jour 5; CCL₄+DES2 = lots des animaux ayant reçu une dose unique de CCl₄ et quotidiennement l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel, puis sacrifiés le jour 5; CCL₄+Si = lots des animaux ayant reçu une dose unique de CCl₄ et quotidiennement la silymarine à la dose de 100 mg/kg de poids corporel, puis sacrifiés le jour 5; DES2 = lots des animaux ayant reçu quotidiennement de l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel et sacrifiés le jour 5.

L'administration de la dose unique de CCl₄ a entraîné une baisse de l'expression de la protéine Sox 17 lorsqu'on compare l'intensité de fluorescence obtenue du lot des animaux du

groupe contrôle négatif (CCl₄+ED) à celle obtenue du lot des animaux du groupe control normal (HM+ED). Par ailleurs, le traitement quotidien à l'extrait de *D. adscendens* aux doses respectives de 50 et 200 mg/kg (DES1, DES2) de poids corporel chez les animaux préalablement intoxiqués entraîne au jour 5 une augmentation de l'expression de Sox 17. Cette même augmentation d'intensité de fluorescence (augmentation de l'expression de Sox 17) est notée chez les animaux préalablement intoxiqué au CCl₄ et recevant quotidiennement de la silymarine. On note également cette augmentation de l'expression de Sox 17 chez les animaux recevant quotidiennement et ce pendant 5 jours de l'extrait de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel (DES2).

La figure 54 illustre les variations des intensités des fluorescences cellulaires résultantes des microphotographies obtenues des effets de l'administration de l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* sur l'expression de la protéine Sox 17 dans le foie des rats intoxiqués au tétrachlorure de carbone (CCl₄) pendant un, quatre et cinq jours.

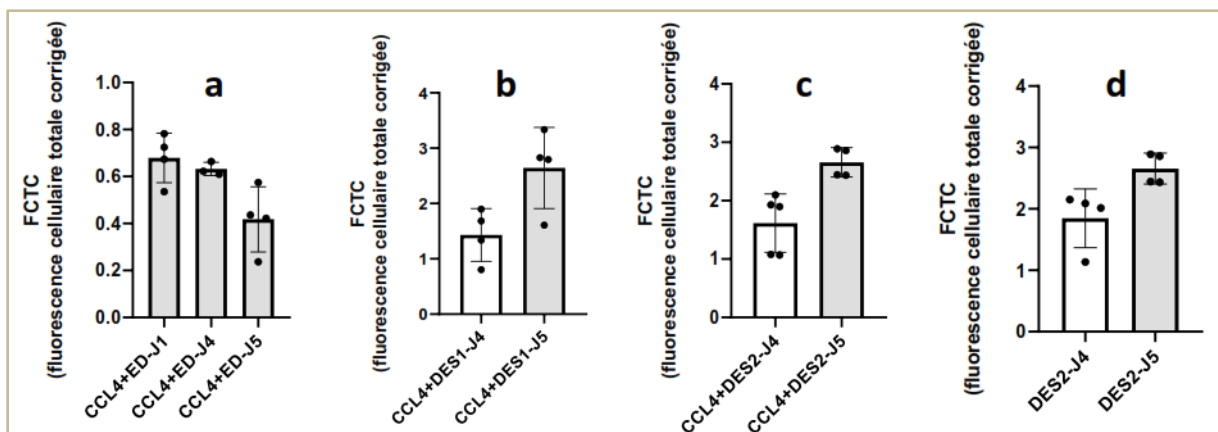


Figure 54: Intensités de la fluorescence cellulaire lors de l'étude en fonction du temps de l'effet de l'administration de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au tétrachlorure de carbone (CCl₄).

Les histogrammes représentent les moyennes ± ESM des intensités de fluorescence cellulaires totales corrigées.

- (a) CCL₄+ED-J1 ; CCL₄+ED-J4 ; CCL₄+ED-J5 = lots des animaux ayant reçu une dose unique de CCl₄ et de l'eau distillée quotidiennement et sacrifiés respectivement aux jours 1, 4 et 5 ;
- (b) CCL₄+DES1-J4 ; CCL₄+DES1-J5 = lots des animaux ayant reçu une dose unique de CCl₄ et l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 50 mg/kg de poids corporel quotidiennement et sacrifiés respectivement les jours 4 et 5 ;
- (c) CCL₄+DES2-J4 ; CCL₄+DES2-J5 = lots des animaux ayant reçu une dose unique de CCl₄ et l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel quotidiennement et sacrifiés respectivement les jours 4 et 5 ;
- (d) DES2-J4 ; DES2-J5 = lots des animaux ayant reçu quotidiennement de l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel et sacrifiés respectivement les jours 4 et 5.

On note dans les lots d'animaux n'ayant reçu que du CCl₄, une réduction en fonction du temps (de J1 à J5) de l'expression de Sox 17, matérialisée par la baisse de l'intensité de fluorescence cellulaire (Figure 52a). Par ailleurs, le traitement quotidien avec l'extrait de *D. adscendens* aux doses respectives de 50 et 200 mg/kg (DES1, DES2) de poids corporel chez les animaux préalablement intoxiqués entraîne une augmentation dans le temps (de J4 à J5) de l'expression de Sox 17 (Figures 52b et 52c). Cette même augmentation d'intensité de fluorescence (augmentation de l'expression de Sox 17) en fonction du temps de traitement est notée chez les animaux recevant quotidiennement de l'extrait de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel (DES2) (Figure 52d).

3.1.9. Effets de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur l'expression des protéines du processus de différenciation et/ou de maturation hépatique via l'expression en fonction du temps du facteur Sox 17 par des rats intoxiqués au Paracétamol

L'évolution en fonction du temps de l'expression de la protéine Sox 17 dans le foie des rats au cours de cette expérimentation a été déterminée à travers la quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue sur les microphotographies de la figure 51.

Plus l'intensité de fluorescence cellulaire est grande, plus grande est l'expression de la protéine Sox17.

La figure 55 illustre au jour 4, les intensités des fluorescences cellulaires résultantes des microphotographies obtenues des effets de l'administration quotidienne de l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* sur l'expression de la protéine Sox 17 dans le foie des rats préalablement intoxiqués au paracétamol.

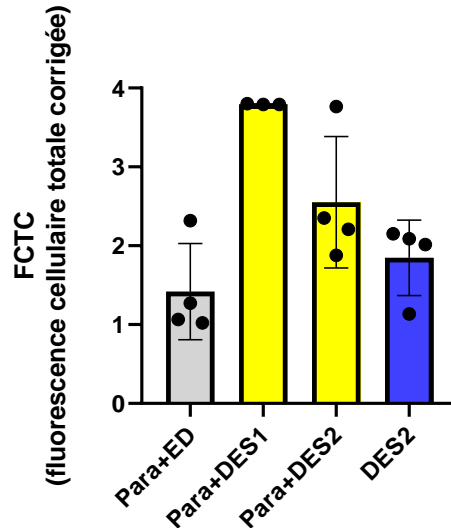


Figure 55: Intensités de la fluorescence cellulaire lors de l'étude de l'effet de l'administration de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au paracétamol au jour 4

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM des intensités de fluorescence cellulaires totales corrigées.

*Para+ED = lots des animaux ayant reçu une dose unique de Para et de l'eau distillée quotidiennement et sacrifiés au jour 4; Para+DES1 = lots des animaux ayant reçu une dose unique de Para et quotidiennement l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 50 mg/kg de poids corporel, puis sacrifiés le jour 4; Para +DES2 = lots des animaux ayant reçu une dose unique de Para et quotidiennement l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel, puis sacrifiés le jour 4; DES2 = lots des animaux ayant reçu quotidiennement de l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel et sacrifiés le jour 4.*

Le traitement quotidien avec l'extrait de *D. adscendens* aux doses respectives de 50 et 200 mg/kg (DES1, DES2) de poids corporel chez les animaux préalablement intoxiqués entraîne au jour 4 une augmentation de l'expression de Sox 17, avec une expression plus poussée avec DES1. Une augmentation d'intensité de fluorescence (augmentation de l'expression de Sox 17) est notée également chez les animaux recevant quotidiennement de l'extrait de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel (DES2).

La figure 56 illustre au jour 5, les intensités des fluorescences cellulaires résultantes des microphotographies obtenues des effets de l'administration quotidienne de l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* sur l'expression de la protéine Sox 17 dans le foie des rats préalablement intoxiqués au paracétamol.

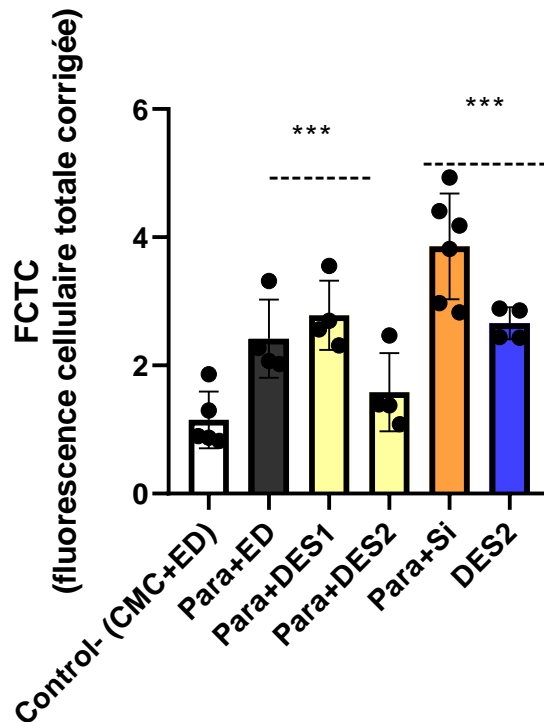


Figure 56: Intensités de la fluorescence cellulaire lors de l'étude de l'effet de l'administration de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au paracétamol au jour 5

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM des intensités de fluorescence cellulaires totales corrigées.

Control-(CMC+ED) = lots des animaux ayant reçu une dose unique de véhicule du paracétamol(carboxyméthylcellulose) et de l'eau distillée quotidiennement et sacrifiés au jour 5; Para+ED = lots des animaux ayant reçu une dose unique de Para et de l'eau distillée quotidiennement et sacrifiés au jour 5; Para+DES1 = lots des animaux ayant reçu une dose unique de Para et quotidiennement l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 50 mg/kg de poids corporel, puis sacrifiés le jour 5 ; Para+DES2 = lots des animaux ayant reçu une dose unique de Para et quotidiennement l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel, puis sacrifiés le jour 5 ; Para+Si = lots des animaux ayant reçu une dose unique de Para et quotidiennement la silymarine à la dose de 100 mg/kg de poids corporel, puis sacrifiés le jour 5; DES2 = lots des animaux ayant reçu quotidiennement de l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel et sacrifiés le jour 5.

L'administration de la dose unique de paracétamol a entraîné une hausse de l'expression de la protéine Sox 17 lorsqu'on compare les intensités de fluorescence obtenues du lot des animaux du groupe control négatif (Para+ED) à celles obtenues du lot des animaux du groupe control normal (HCMC+ED). Par ailleurs, le traitement quotidien à l'extrait de *D. adscendens* aux doses respectives de 50 et 200 mg/kg (DES1, DES2) de poids corporel chez les animaux préalablement intoxiqués entraîne au jour 5 une baisse de l'expression de Sox 17 pour la dose 200 mg/kg et une augmentation à la dose de 50 mg/kg de poids corporel, lorsqu'on les compare au témoin négatif. Une augmentation d'intensité de fluorescence (baisse

de l'expression de Sox 17) est notée chez les animaux préalablement intoxiqués au paracétamol et recevant quotidiennement de la silymarine. On note également une légère augmentation de l'expression de Sox 17 chez les animaux recevant quotidiennement et ce pendant 5 jours de l'extrait de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel (DES2).

La figure 57 illustre les variations des intensités des fluorescences cellulaires résultantes des microphotographies obtenues des effets de l'administration de l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* sur l'expression de la protéine Sox 17 dans le foie des rats intoxiqués au paracétamol pendant un, quatre et cinq jours.

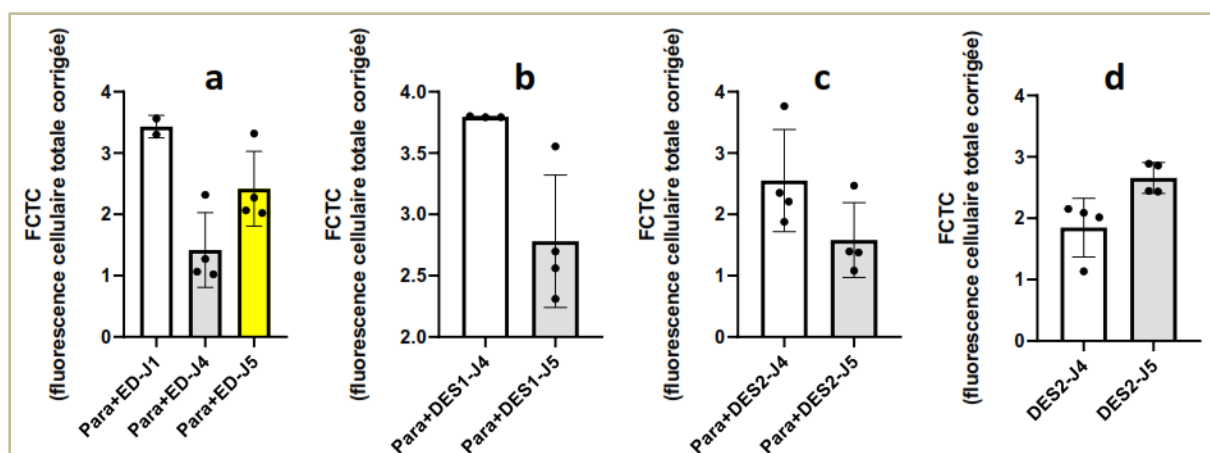


Figure 57: Intensités de la fluorescence cellulaire lors de l'étude en fonction du temps de l'effet de l'administration de l'extrait aqueux de *D. adscendens* sur l'expression de la protéine SOX 17 dans le foie des rats intoxiqués au paracétamol.

Les histogrammes représentent les moyennes \pm ESM des intensités de fluorescence cellulaires totales corrigées.

- (a) Para+ED-J1 ; Para+ED-J4 ; Para+ED-J5 = lots des animaux ayant reçu une dose unique de Para et de l'eau distillée quotidiennement et sacrifiés respectivement aux jours 1, 4 et 5 ;
- (b) Para+DES1-J4 ; Para+DES1-J5 = lots des animaux ayant reçu une dose unique de Para et l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 50 mg/kg de poids corporel quotidiennement et sacrifiés respectivement les jours 4 et 5 ;
- (c) Para+DES2-J4 ; Para+DES2-J5 = lots des animaux ayant reçu une dose unique de Para et l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel quotidiennement et sacrifiés respectivement les jours 4 et 5 ;
- (d) DES2-J4 ; DES2-J5 = lots des animaux ayant reçu quotidiennement de l'extrait aqueux de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel et sacrifiés respectivement les jours 4 et 5.

On note dans les lots d'animaux n'ayant reçu que du paracétamol, une réduction de l'expression de Sox 17, matérialisée par la baisse de l'intensité de fluorescence cellulaire (Figure 57a). Cette baisse est plus prononcée le jour 4 que le jour 5. Par ailleurs, le traitement quotidien avec l'extrait de *D. adscendens* aux doses respectives de 50 et 200 mg/kg (DES1, DES2) de poids corporel chez les animaux préalablement intoxiqués entraîne une baisse dans le temps (de J4 à J5) de l'expression de Sox 17 (Figures 57b et 57c). Cette baisse d'expression

de Sox 17 du jour 4 au jour 5 chez les animaux préalablement intoxiqués et traités à DES1 et DES2 respectivement semble corréler avec l'augmentation de l'expression de ce facteur pendant la même tranche de temps (du J4 au J5) chez les animaux du groupe contrôle positif (Para+ED). On note par ailleurs une augmentation d'intensité de fluorescence (augmentation de l'expression de Sox 17) en fonction du temps de traitement chez les animaux recevant quotidiennement de l'extrait de *D. adscendens* à la dose de 200 mg/kg de poids corporel (DES2) (Figure 57d).

3.1.10. Conclusion partielle 2

Au terme de cette deuxième partie de notre travail dont l'objectif était d'étudier l'effet *D. adscendens* sur l'expression de quelques marqueurs du processus de différenciation et de la maturation hépatocytaire chez les rats intoxiqués au paracétamol et au CCl₄, il ressort sur des résultats que *D. adscendens* stimulerait la maturation des cellules de l'endoderme définitif (principales cellules de la voie de différenciation des cellules souches en hépatocytes) via l'expression de la protéine Sox17.

3.2. DISCUSSION

La phytothérapie, qui est basée sur les principes actifs naturels et les extraits de plantes, a toujours occupé une place importante dans le traitement des maladies humaines et animales. L'utilisation à des fins thérapeutiques des plantes a augmenté de plus de trois fois cette dernière décennie (**Liu et al., 2011**).

Dans le domaine de l'hépatologie, et ce malgré les progrès significatifs, les maladies du foie sont en constante augmentation dans le monde et comptent parmi les causes de mortalité les plus élevées (**Cainelli & Iacobucci, 2012**). Ces maladies sont un problème majeur de santé dans le monde entier en général, avec une forte endémicité dans les pays en développement (**Adewusi & Afolayan, 2010**).

Selon les différentes causes des affections hépatiques, on distingue entre autres les hépatites infectieuses liées aux agents infectieux, les hépatites toxiques provoquées par les intoxications aux toxiques naturels tels que la phalloïdine et l'aflatoxine, les toxiques industriels tels que le tétrachlorure de carbone, l'alcool éthylique, le plomb et les médicaments (**Ouattara et al., 2003**). Par ailleurs, les hépatites toxiques et virales sont les causes majeures des maladies du foie et partagent toutes une progression similaire caractérisée par le développement de la cirrhose et du cancer de foie (**K. Gao et al., 2012; Ivanov et al., 2013**).

Les hépatites toxiques sont principalement dues aux polluants environnementaux et aux médicaments. Parmi les polluants de l'environnement, le CCl₄ est un puissant hépatotoxique qui continue d'être utilisé au laboratoire pour évaluer les propriétés anti-hépatotoxiques des substances phytochimiques en utilisant aussi bien les techniques *in vivo* que *in vitro* (**Lim et al., 2016; Xiao et al., 2012**). Quant aux médicaments spécifiquement, on distingue entre autres le paracétamol (APAP), l'analgésique et l'antipyrétique le plus utilisé dans le monde qui est bien toléré à la dose thérapeutique, mais peut induire une hépatotoxicité très sévère et parfois la mort en cas d'overdose (**James et al., 2003**).

Malgré les progrès de la médecine moderne, il n'y a pas encore de médicaments capables de stimuler la fonction hépatique, d'offrir une protection hépatique contre les dommages ou de contribuer à la régénération des cellules hépatiques. La médecine traditionnelle par les plantes offre une alternative pour la recherche de nouvelles molécules et formulations plus accessibles et efficaces. Elle constitue de ce fait une source précieuse de nouveaux agents médicinaux (**Adewusi & Afolayan, 2010**).

Dans la présente étude, la capacité de *Desmodium adscendens* (plante de la famille des Fabacées) à protéger les hépatocytes primaires de rat contre les lésions aiguës induites par le CCl₄ et sa capacité à médier l'inhibition de l'infection à VHCcc *in vitro* a été évaluée. Dans un deuxième temps, la capacité de *D. adscendens* à participer au processus de stimulation de la régénération des hépatocytes et/ou la différenciation des cellules souches en hépatocytes, lorsque le foie est soumis à une agression par le CCl₄ ou le paracétamol a été évaluée *in vivo*.

Étant donné que les changements associés aux lésions hépatiques induites par le CCl₄ sont similaires à ceux de l'hépatite virale aiguë (**Rubinstein, 1962**), l'hépatotoxicité médiée par le CCl₄ a été choisie comme modèle expérimental *in vitro*. Il est connu que le stress oxydatif et la génération de radicaux libres jouent un rôle essentiel dans les lésions hépatiques induites par le CCl₄ (**el halawany et al., 2014**). En effet, la majorité des agents toxiques agissent en augmentant la production des radicaux libres qui peuvent conduire à un stress oxydatif excessif et à un dysfonctionnement mitochondrial hépatique (**Amacher, 2012**). Le mécanisme par lequel le CCl₄ provoque une lésion oxydative des cellules implique que le système du cytochrome P-450 transforme CCl₄ en CCl₃ et ce dernier est transformé en CCl₃O₂, plus réactif, qui provoque la peroxydation lipidique, perturbe l'homéostasie Ca²⁺ et conduit à la mort cellulaire (**B. Y. Gao et al., 2003; Rubinstein, 1962**).

La lésion hépatique induite par CCl₄ est couramment utilisée comme méthode expérimentale pour l'étude de l'effet hépatoprotecteur des plantes médicinales (**Krishna et al., 2010**). L'utilisation de la culture d'hépatocytes de rat réduit le nombre d'animaux sacrifiés pour l'étude de l'activité hépatoprotectrice (**Krause et al., 2009**). De plus, les hépatocytes isolés à haut rendement sont devenus un outil précieux pour évaluer l'effet protecteur possible des médicaments. Il a été démontré que certaines hépatotoxines telles que le tétrachlorure de carbone (CCl₄) provoquent une diminution de la viabilité cellulaire ainsi qu'une augmentation de certains marqueurs (**Krause et al., 2009; Krishna et al., 2010**). En effet, il y a d'une part l'augmentation du taux de transaminases (ALAT, ASAT), enzymes cytosoliques dont leur élévation dans le milieu extracellulaire est un signe d'altération de l'intégrité de la membrane cellulaire, et d'autre part l'augmentation de la concentration de MDA, qui indique une peroxydation lipidique membranaire (**Krause et al., 2009; Krishna et al., 2010**). La capacité d'un médicament hépatoprotecteur à réduire les effets nocifs ou à préserver les mécanismes physiologiques hépatiques normaux qui ont été perturbés par une hépatotoxine est un indice de ses effets protecteurs (**Jagatia et al., 2013**).

Globalement, dans la première section de cette étude où il était question d'une part de déterminer *in vitro* le pouvoir antioxydant des extraits de *D. adscendens* et d'autre part, de déterminer les propriétés antihépatotoxiques de ces extraits en utilisant comme modèle les hépatocytes de rats fraîchement isolés, on note un rendement élevé d'hépatocytes isolés et des modifications générales grâce à l'évaluation des marqueurs, reflétant ainsi la satisfaction avec la standardisation de notre modèle expérimental choisi. En effet, le CCl₄ a été utilisé à une concentration de 5 mM. Cette concentration s'est avérée toxique pour une exposition de 6 h aux hépatocytes conduisant à une diminution d'environ 50% de la viabilité cellulaire et à une forte augmentation des fuites d'ALAT. Cela indique une perte d'intégrité de la membrane des hépatocytes et une formation de MDA témoignant de l'oxydation de la membrane lipidique. Dans le prétraitement des hépatocytes avec des extraits de *D. adscendens*, il a été noté une protection contre l'hépatotoxicité induite par CCl₄ comme le montrent les figures 30a, 30b et 30c. Ici, à la concentration de 1 µg / mL, la viabilité cellulaire a été maintenue tandis qu'une diminution significative ($p < 0,01$) de la formation de MDA et une inhibition de la libération d'ALAT ont été notées. Dans le post-traitement des hépatocytes avec des extraits de *D. adscendens*, après intoxication par CCl₄, il a également été noté une restauration / protection comme le montrent les figures 31a, 31b et 31c. Ici, à des concentrations de 1, 10 et 100 µg / mL, la viabilité cellulaire a également été maintenue tandis qu'une diminution significative ($p < 0,01$) de la formation de MDA et une fuite inhibée d'ALT ont également été notées. La variation de la bioactivité entre la plante récoltée avant la floraison (DA1) et celle récoltée après la floraison (DA2) pourrait être due à la composition des métabolites secondaires qui varient selon les saisons. En effet, des facteurs environnementaux tels que la lumière, la température, l'eau du sol, la fertilité du sol et la salinité ont un impact sur la biosynthèse et l'accumulation des métabolites secondaires des plantes, et donc leur efficacité pharmacologique (Moula et al., 2004).

Dans les tests avant et après traitement, ces résultats suggèrent que les extraits de DA protègent le foie par des effets antioxydants. Ces effets ont été confirmés par les activités antiradicalaires des extraits de DA1 et DA2, leurs capacités réductrices (ions ferriques et molybdate) et l'inhibition de la peroxydation lipidique. Ces résultats sont conformes aux études antérieures qui ont démontré le potentiel des extraits de plantes pour protéger le foie contre l'hépatotoxicité induite par CCl₄ en inhibant la peroxydation lipidique et en améliorant l'activité antioxydante (Moula et al., 2004).

La place du stress oxydatif dans la pathogenèse de l'hépatite virale et en particulier dans l'infection par le virus de l'hépatite C a été précédemment documentée (**Paracha et al., 2013; Tardif et al., 2005**). Il a été démontré que la protéine nucléocapside du VHC augmente le stress oxydatif dans le foie (**Koike et al., 2006**) et que certaines protéines du complexe de réplication (NS3 et NS5A) ont augmenté l'absorption de calcium par les mitochondries et provoqué l'oxydation du glutathion mitochondrial, entraînant une augmentation des espèces réactives à l'oxygène (ERO) (**Yen et al., 2011**). Par conséquent, il était important pour nous d'évaluer les propriétés antivirales des extraits de DA sur le VHC. La présente étude a permis d'identifier pour la première fois *D. adscendens* comme un inhibiteur de l'infection et de la réplication du VHC (Figures 32 et 33), suggérant ainsi un effet possible de cette plante sur différentes étapes du cycle de vie du VHC, y compris l'entrée, la réplication et l'assemblage. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour clarifier le mécanisme anti-VHC exact de cet extrait de plante naturelle et caractériser pleinement les métabolites secondaires potentiellement actifs.

Au cours de l'hépatotoxicité des xénobiotiques, l'accumulation des métabolites réactifs, dont les radicaux libres CCl_3° et $\text{CCl}_3\text{OO}^\circ$ et le NAPQI, issus de la biotransformation du CCl_4 et du paracétamol respectivement, entraînent la déplétion du GSH et l'inactivation des enzymes (**Brattin et al., 1985; Hinson et al., 2010**). Le GSH et les enzymes antioxydants sont considérés comme ayant un pouvoir antiradicalaire/antioxydant qui contribue au maintien de l'intégrité cellulaire et constituent une première ligne de défense intracellulaire. Bien que la diminution de la teneur en GSH ne conduise pas directement à la mort des hépatocytes, cette déplétion entraîne l'inactivation des enzymes antioxydants et conduit à une génération excessive d'EROs intracellulaires aboutissant au stress oxydant (**Jaeschke et al., 2002; Schnackenberg et al., 2009**). L'augmentation anormale du taux d'EROs initie le processus de peroxydation des lipides membranaires et cause la perte de l'intégrité de la membrane plasmique, la destruction des organites cellulaires et la mort des cellules (**Brattin et al., 1985; Jaeschke et al., 2002**).

En exposant les rats à une dose toxique de xénobiotiques (CCl_4 ou paracétamol), des dysfonctionnement de leur organisme sont mis en évidence par une diminution du taux de GSH indiquant le stress oxydant, une augmentation du taux de MDA indiquant la peroxydation des lipides membranaires et une élévation de l'activité des transaminases dans le milieu extracellulaire comme signe de l'altération de l'intégrité membranaire avec pour

conséquence finale la baisse de la viabilité cellulaire (**Jaeschke et al., 2002, 2003b; Kadiiska et al., 2000; Pratibha et al., 2006; Zaidi et al., 2019**).

Dans la partie de l'expérimentation conduite *in vivo* lors de cette étude, l'intoxication des rats par des doses élevées de CCl₄ ou de paracétamol a entraîné une augmentation significative de l'activité des transaminases et des taux de MDA, une baisse de glutathion et de l'activité de la catalase comparativement aux rats non traités. Le traitement par la suite des animaux intoxiqués avec l'extrait aqueux de *D. adscendens* a conduit à certaines modulations biochimiques favorables à la protection, traduisant son rôle adaptatif contre les dommages des radicaux libres. En effet, on note après cinq jours consécutifs de traitement des animaux avec différentes doses de *D. adscendens*, des activités en baisse d'ALAT (Figures 34 et 42), de PAL (Figures 36 et 44), de taux de MDA (Figure 37) et des augmentations de GSH (Figures 40 et 48) et d'activité de la catalase (Figures 39 et 47)) comparés aux rats intoxiqués et non traités.

Cette étude a clairement montré que l'administration intragastrique d'extrait brut de feuilles de *D. adscendens* module de manière significative les activités circulantes de CAT, GSH, ASAT, ALAT et PAL. Ces résultats traduisent un potentiel anti-hépatotoxique du *D. adscendens* et l'identifie comme antioxydant ou piègeur de radicaux libres à travers le retour des activités perturbées de la CAT et les niveaux de TBARS, GSH, ALAT, ASAT et PAL vers leurs valeurs normales, par rapport aux témoins non traités ou aux groupes traités seuls.

D. adscendens posséderait divers composés qui sont responsables de diverses activités. En effet, la littérature rapporte comme principaux composants actifs contenus dans *D. adscendens*, la présence des saponosides triterpénoïdes (soyasaponines I et III, déhydrosoyasaponine I), des flavonoïdes (vitexin and isovitexin, isoflavone, composé flavonique, dérivés de flavonol et de flavone), des anthocyanes (pélagonidine-3-0-rhamnoside, cyanidine-3-0-sophoroside) et alcaloïdes sous forme de traces (**Magielse et al., 2013b; Pothier et al., 2006a; Rastogi et al., 2011**).

Sur un autre plan, en cas d'atteinte du foie lors de l'intoxication par divers toxiques, les hépatocytes détruits sont remplacés au cours du processus de régénération qui s'opère selon différents mécanismes à savoir : la division cellulaire, la maturation des cellules immatures restantes ou encore le recrutement et la différenciation en hépatocytes des cellules souches.

En effet, les hépatocytes et les cellules des voies biliaires proviennent d'un précurseur commun, l'hépatoblaste (**Germain et al., 1988b**), lui-même provenant l'endoderme (**Zorn, 2008b**). Les hépatoblastes au départ expriment des gènes associés à la fois aux hépatocytes adultes (Hnf4 α , albumine) et aux BEC (cytokératine-19), ainsi qu'aux gènes du foie foetal tels que l' α -foetoprotéine (Afp). L'endoderme quand à lui exprime le Sox 17 qui est un membre du groupe à haute mobilité lié à Sry (Sry-HMG) des facteurs de transcription qui est nécessaire pour la formation endodermique et le développement du foie chez plusieurs espèces (**Ayatollah et al., 2012**). L'expression du gène Sox17 est requise pour la formation d'un endoderme définitif qui donne naissance à divers tissus (**Ayatollah et al., 2012**).

Le foie adulte a une capacité de régénération remarquable et peut reconstituer complètement lorsque jusqu'à 70% de sa masse est éliminée (**Fausto, 2004; Michalopoulos, 2007**). Le foie se régénère principalement par la prolifération d'hépatocytes matures (**Fausto, 2004; Michalopoulos, 2007**). En effet, les hépatocytes ont une durée de vie longue, estimée à 200 jours chez le rat et à 400 jours chez l'homme. Ces hépatocytes conservent leurs capacités de division cellulaire et sont capables de se multiplier, sans perdre leur différenciation, en réponse à des facteurs de croissance. Leur taux de renouvellement est extrêmement faible. Ainsi, à l'état normal, dans le foie humain, le pourcentage d'hépatocytes en cycle cellulaire à un instant donné serait de l'ordre de 4 pour 1 000.

Cependant, le foie adulte contient également des cellules progénitrices hépatiques qui sont activées lorsque la prolifération des hépatocytes est inhibée, comme dans la cirrhose sévère (**Fausto, 2004; Oertel & Shafritz, 2008**). Les progéniteurs hépatiques semblent résider dans les petits canaux biliaires terminaux et lorsqu'ils sont activés, ils prolifèrent et donnent naissance à une population cellulaire appelée «cellules ovales», qui peut se différencier à la fois en hépatocytes et en cellules biliaires (**Fougère-Deschatrette et al., 2006; Oertel & Shafritz, 2008**).

Un certain nombre des voies de développement qui régulent l'hépatogenèse dans l'embryon, comme HGF, FGF, OSM, TNF α et Wnt semblent contrôler l'activation des cellules ovales (**Apte et al., 2008; Bliege Bird et al., 2008; Hu et al., 2007**) ainsi que la prolifération des hépatocytes pendant la régénération (**Fausto, 2004; Loughnane et al., 2002; Michalopoulos, 2007; Tan et al., 2006**).

Dans ce travail, l'effet de l'extrait aqueux de *D. adscendens* dans le mécanisme de la différenciation des cellules souches en hépatocytes dans le processus de régénération hépatique chez le rat intoxiqué au CCl₄ ou au paracétamol a également été exploré. L'immunohistochimie a permis d'apprécier le recrutement des cellules souches et leur différenciation en hépatocytes dans nos différents lots à travers l'expression des marqueurs spécifiques de ce processus de renouvellement cellulaire. L'aspect et l'intensité de la fluorescence sont deux éléments essentiels pour y parvenir (**Alison et al., 1997**). En effet, certaines protéines de l'organisme peuvent être mises en évidence par des anticorps spécifiques couplés à des traceurs et dans ce cas précis, l'immunofluorescence indirecte a été utilisée. Il s'agit d'une technique d'immuno-marquage qui consiste à détecter un antigène grâce à un anticorps monoclonal spécifique de cet antigène, puis à révéler cette reconnaissance par une antiglobuline (anticorps secondaire) marquée qui se fixe à l'anticorps monoclonal. Cette antiglobuline peut être marquée par un fluorophore comme la fluorescéine ou un autre fluorochrome. Une lecture en microscopie à fluorescence permet de visualiser les cellules fluorescentes et de déterminer les intensités de fluorescences. L'intensité de fluorescence cellulaire a été quantifiée en utilisant le logiciel *Image J*. Les différentes analyses immunohistochimiques ont révélé une intensité de la fluorescence moindre chez les lots traités au CCl₄ ou au paracétamol, comparés aux lots témoin normal et ceux intoxiqués et traités par l'extrait aqueux de *D. adscendens*, traduisant ainsi un effet sur l'expression des différentes protéines marqueurs spécifiques (Figures 50 et 51).

Toutefois, on note lors de l'immunofluorescence de la protéine Sox17 une expression plus importante de ces protéines lors des différentes expérimentations les concernant. Ceci s'expliquerait par le fait que la durée du traitement des animaux avant leur sacrifice étant de cinq jours, seule la protéine Sox17 est le marqueur pouvant s'exprimer en majorité. En effet, après quelques jours, la plupart des cellules expriment des gènes endodermiques définitifs (Sox17 et Foxa2) (**D'Amour et al., 2005; Kubo et al., 2004**). Fort de cette propriété de pouvoir être exprimée en cinq jours, la cinétique de recrutement des hépatocytes a été faite en utilisant la propriété de suivre l'apparition des protéines Sox17 en fonction du temps. La baisse de l'intensité de fluorescence notée chez les animaux intoxiqués comparés au lot témoin non intoxiqué traduit une diminution de l'expression de la protéine Sox 17 due à l'action du toxique (Figure 53). A l'inverse, les intensités croissantes des fluorescences résultantes des microphotographies obtenues des effets de l'administration de l'extrait aqueux de *D. adscendens* traduisent l'augmentation de l'expression de la protéine Sox17 dans le foie

des rats intoxiqués préalablement au tétrachlorure de carbone (CCl₄) ou au paracétamol aux jours quatre et cinq (Figures 52, 53, 55 et 56). Cette augmentation illustre le développement de l'endoderme, précurseur de l'hépatoblaste à l'origine des hépatocytes. La baisse d'intensité de fluorescence en fonction du temps notée chez les animaux intoxiqués au CCl₄ ou au paracétamol (Figures 54a et 57a) traduit une diminution dans l'expression de la protéine Sox 17. Par ailleurs, on note qu'en présence de l'extrait de plante à la même dose, une variation en fonction du temps de l'expression de Sox17 (Figures 54b, 54c, 57b, 57c). Cette augmentation progressive des cellules traduirait la différenciation en fonction du temps des cellules souches en hépatocytes.

**CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

IV.1. CONCLUSION

Au terme de ce travail dont l'objectif général est d'évaluer *in vitro* et/ou *in vivo* les propriétés anti-hépatotoxiques et antivirales de l'extrait aqueux de *Desmodium adscendens* sur le VHC et son effet sur dans le processus de différenciation des cellules souches en hépatocytes, les conclusions majeures ci-après se dégagent:

- L'extrait aqueux de *D. adscendens* a un potentiel hépatoprotecteur et hépatocurateur contre les dommages induits par le CCl₄ sur les hépatocytes primaires de rat. L'inhibition du stress oxydatif et la capacité à protéger l'intégrité de la membrane par cet extrait végétal semblent être les mécanismes clés de son activité.
- L'extrait aqueux de *D. adscendens* a révélé une activité anti-VHC en culture cellulaire.
- L'extrait aqueux de *D. adscendens* stimule chez des animaux intoxiqués au CCl₄ ou au paracétamol, une augmentation de l'expression du facteur Sox 17, marqueur spécifique de développement hépatique via la maturation des cellules de l'endoderme définitif (principales cellules de la voie de différenciation des cellules souches en hépatocytes).

Il se dégage donc clairement de cette étude le caractère protecteur du foie par *D. adscendens* qu'il soit exposé à une agression par un toxique environnemental (CCl₄), un médicament (paracétamol) ou par un virus (Virus de l'hépatite C), ce qui justifierait et soutiendrait son utilisation dans la médecine traditionnelle pour la gestion des hépatopathies.

IV.2. PERSPECTIVES

Nous nous proposons de mener des études ultérieures qui nous permettront :

- D’entreprendre l’identification des constituants potentiellement actifs et de clarifier leur rôle dans l’activité anti-VHC.
- D’explorer l’influence de *D. adscendens* dans la différenciation des cellules souches en hépatocytes en un temps plus long et en utilisant des marqueurs de différenciation plus spécifiques au tissu hépatique.

REFERENCES

Bibliographie

- Adams, R. L., Pirakitikulr, N., & Pyle, A. M. (2017).** Functional RNA structures throughout the Hepatitis C Virus genome. *Current Opinion in Virology*, 24, 79- 86. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.04.007>
- Adewusi, E., & Afolayan, A. (2010).** A review of natural products with hepatoprotective activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 1318- 1334. <https://doi.org/10.5897/jmpr09.472>
- Ahmadipour, A., Sharififar, F., Nakhaipour, F., Samanian, M., & Karami-Mohajeri, S. (2015).** Hepatoprotective effect of Zataria Multiflora Boisson cisplatin-induced oxidative stress in male rat. *Journal of Medicine and Life*, 8 (Spec Iss 4), 275- 281.
- Alison, M., Golding, M., Lalani, E.-N., Nagy, P., Thorgeirsson, S., & Sarraf, C. (1997).** Wholesale hepatocytic differentiation in the rat from ductular oval cells, the progeny of biliary stem cells. *Journal of hepatology*, 26, 343- 352. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(97\)80051-7](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(97)80051-7)
- Amacher, D. E. (2012).** The primary role of hepatic metabolism in idiosyncratic drug-induced liver injury. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 8(3), 335- 347. <https://doi.org/10.1517/17425255.2012.658041>
- Amar-Costesec, A. (1989).** Réticulum endoplasmique : Anatomie d'une membrane biologique. *Reproduction Nutrition Développement*, 29(6), 621- 638. <https://doi.org/10.1051/rnd:19890601>
- Ananth, R. (2018).** Neonatal Cholestasis : A Primer of Selected Etiologies. *Pediatric Annals*, 47(11), e433- e439. <https://doi.org/10.3928/19382359-20181018-01>
- Apte, U., Thompson, M. D., Cui, S., Liu, B., Cieply, B., & Monga, S. P. S. (2008).** Wnt/ β -catenin signaling mediates oval cell response in rodents. *Hepatology*, 47(1), 288- 295. <https://doi.org/10.1002/hep.21973>
- Aruoma, O. I., Deiana, M., Rosa, A., Casu, V., Piga, R., Peccagnini, S., Dessì, M. A., Ke, B., Liang, Y.-F., & Higa, T. (2002).** Assessment of the ability of the antioxidant cocktail-derived from fermentation of plants with effective microorganisms (EM-X) to modulate oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo : Studies upon the profile of poly-and mono-unsaturated fatty acids. *Toxicology letters*, 135(3), 209–217.
- Asumda, F. Z., Hatzistergos, K. E., Dykxhoorn, D. M., Jakubski, S., Edwards, J., Thomas, E., & Schiff, E. R. (2018).** Differentiation of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells using small molecules. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 101, 16- 24. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.03.002>

- Averhoff, F. M., Glass, N., & Holtzman, D. (2012).** Global burden of hepatitis C : Considerations for healthcare providers in the United States. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55 Suppl 1, S10-15. <https://doi.org/10.1093/cid/cis361>
- Ayatollah M, Sanati M, S., Kabir-Salmani M, K. S., & Geramizaeh B. (2012).** Differential expression pattern of the human endoderm-specific transcription factor sox17 in various tissues and cells. *International Journal of Organ Transplantation Medicine*, 3(4), 183-187.
- Banales, J. M., Huebert, R. C., Karlsen, T., Strazzabosco, M., LaRusso, N. F., & Gores, G. J. (2019).** Cholangiocyte pathobiology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(5), 269- 281. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0125-y>
- Basu, S. (2003).** Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation : Eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1- 2), 113- 127. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00157-4](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00157-4)
- Bebarta, V. S., Tanen, D. A., Lairt, J., Dixon, P. S., Valtier, S., & Bush, A. (2010).** Hydroxocobalamin and sodium thiosulfate versus sodium nitrite and sodium thiosulfate in the treatment of acute cyanide toxicity in a swine (*Sus scrofa*) model. *Annals of emergency medicine*, 55(4), 345–351.
- Bedossa, P. (2017).** Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 37 Suppl 1, 85- 89. <https://doi.org/10.1111/liv.13301>
- Bilgic, Y., Yilmaz, C., Cagin, Y. F., Atayan, Y., Karadag, N., & Harputluoglu, M. M. M. (2017).** Albendazole Induced Recurrent Acute Toxic Hepatitis : A Case Report. *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, 80(2), 309- 311.
- Blaner, W. S., O’Byrne, S. M., Wongsiriroj, N., Kluwe, J., D’Ambrosio, D. M., Jiang, H., Schwabe, R. F., Hillman, E. M. C., Piantedosi, R., & Libien, J. (2009).** Hepatic stellate cell lipid droplets : A specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 467- 473. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.11.001>
- Blažeković, B., Vladimir-Knezevic, S., Brantner, A., & Bival Štefan, M. (2010).** Evaluation of Antioxidant Potential of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. ’Budrovka’ : A Comparative Study with *L. angustifolia* Mill. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15, 5971- 5987. <https://doi.org/10.3390/molecules15095971>

- Bliege Bird, R., Bird, D. W., Coddling, B. F., Parker, C. H., & Jones, J. H. (2008).** The “fire stick farming” hypothesis: Australian Aboriginal foraging strategies, biodiversity, and anthropogenic fire mosaics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 14796- 14801. <https://doi.org/10.1073/pnas.08047571105>
- Boveris, A., & Cadenas, E. (1975).** Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Letters*, 54(3), 311- 314. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80928-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80928-8)
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248- 254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brattin, W. J., Glende, E. A., & Recknagel, R. O. (1985).** Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1(1), 27- 38. [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90026-1](https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90026-1)
- Breitbach, C. J., Moon, A., Burke, J., Hwang, T.-H., & Kirn, D. H. (2015).** A Phase 2, Open-Label, Randomized Study of Pexa-Vec (JX-594) Administered by Intratumoral Injection in Patients with Unresectable Primary Hepatocellular Carcinoma. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1317, 343- 357. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2727-2_19
- Brokhman, I., Xu, J., Coles, B. L. K., Razavi, R., Engert, S., Lickert, H., Babona-Pilipos, R., Morshead, C. M., Sibley, E., Chen, C., & van der Kooy, D. (2019).** Dual embryonic origin of the mammalian enteric nervous system. *Developmental Biology*, 445(2), 256- 270. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.11.014>
- Cainelli, G., & Iacobucci, D. (2012).** Agglomeration, Related Variety, and Vertical Integration. *Economic Geography*, 88(3), 255- 277. <https://doi.org/10.1111/j.1944-8287.2012.01156.x>
- Calland, N., Dubuisson, J., Rouillé, Y., & Séron, K. (2012).** Hepatitis C virus and natural compounds: A new antiviral approach? *Viruses*, 4(10), 2197- 2217. <https://doi.org/10.3390/v4102197>
- Cavalieri, B., Perrelli, M.-G., Aragno, M., Mastrocola, R., Corvetti, G., Durazzo, M., Poli, G., & Cutrì, J. C. (2002).** Ischemic preconditioning attenuates the oxidant-dependent mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of*

- Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 8(11), 990- 999.
<https://doi.org/10.1053/jlts.2002.35549>
- Chalchat, J.-C., Garry, R.-P., Menut, C., Lamaty, G., Malhuret, R., & Chopineau, J. (1997).** Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *Journal of essential oil research*, 9(1), 67–75.
- Chan, M. F., & Werb, Z. (2015).** Confocal Imaging of Myeloid Cells in the Corneal Stroma of Live Mice. *Bio-Protocol*, 5(13), e1517. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1517>
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979).** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527- 605.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>
- Chao, X., Wang, H., Jaeschke, H., & Ding, W.-X. (2018).** Role and mechanisms of autophagy in acetaminophen-induced liver injury. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 38(8), 1363- 1374.
<https://doi.org/10.1111/liv.13866>
- Chen, X.-F., Tian, M.-X., Sun, R.-Q., Zhang, M.-L., Zhou, L.-S., Jin, L., Chen, L.-L., Zhou, W.-J., Duan, K.-L., Chen, Y.-J., Gao, C., Cheng, Z.-L., Wang, F., Zhang, J.-Y., Sun, Y.-P., Yu, H.-X., Zhao, Y.-Z., Yang, Y., Liu, W.-R., ... Ye, D. (2018).** SIRT5 inhibits peroxisomal ACOX1 to prevent oxidative damage and is downregulated in liver cancer. *EMBO Reports*, 19(5).
<https://doi.org/10.15252/embr.201745124>
- Chen, Z., Chen, L., Liu, R., Lin, Y., Chen, S., Lu, S., Lin, Z., Chen, Z., Wu, C., & Xiao, Y. (2018).** The osteoimmunomodulatory property of a barrier collagen membrane and its manipulation via coating nanometer-sized bioactive glass to improve guided bone regeneration. *Biomaterials Science*, 6(5), 1007- 1019.
<https://doi.org/10.1039/c7bm00869d>
- Cheng, C., Ma, X., Yan, X., Sun, F., & Li, L. M. (2006).** MARD : A new method to detect differential gene expression in treatment-control time courses. *Bioinformatics*, 22(21), 2650- 2657. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl451>
- Chew, C. F., Vijayan, R., Chang, J., Zitzmann, N., & Biggin, P. C. (2009).** Determination of pore-lining residues in the hepatitis C virus p7 protein. *Biophysical Journal*, 96(2), L10-12. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.004>
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989).** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral

- hepatitis genome. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4902), 359- 362.
<https://doi.org/10.1126/science.2523562>
- Clotman, F., & Lemaigre, F. P. (2006).** Control of Hepatic Differentiation by Activin/TGF β Signaling. *Cell Cycle*, 5(2), 168- 171.
<https://doi.org/10.4161/cc.5.2.2341>
- Cotoi, C. G., Khorsandi, S. E., Pleșea, I. E., & Quaglia, A. (2012).** Histological aspects of post-TACE hepatocellular carcinoma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie*, 53(3 Suppl), 677- 682.
- Dalton, D. A., Baird, L. M., Langeberg, L., Taugher, C. Y., Anyan, W. R., Vance, C. P., & Sarath, G. (1993).** Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root nodules. *Plant Physiology*, 102(2), 481–489.
- D’Amour, K. A., Agulnick, A. D., Eliazar, S., Kelly, O. G., Kroon, E., & Baetge, E. E. (2005).** Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nature Biotechnology*, 23(12), 1534- 1541.
<https://doi.org/10.1038/nbt1163>
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., & Subramani, S. (1987).** Firefly luciferase gene : Structure and expression in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 7(2), 725- 737. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.2.725>
- EASL, Clinical practice guidelines panel, Wendon, Panel members, Cordoba, J., Dhawan, A., Larsen, F. S., Manns, M., Samuel, D., Simpson, K. J., Yaron, I., EASL Governing Board representative, & Bernardi, M. (2017).** EASL. *Journal of Hepatology*, 66(5), 1047- 1081. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.12.003>
- el halawany, A., Dine, R., & El Sayed, N. (2014).** Protective Effect of Aframomum melegueta phenolics Against CCl₄-Induced Rat Hepatocytes Damage; Role of Apoptosis and Pro-inflammatory Cytokines inhibition. *Scientific reports*, 4, 5880.
<https://doi.org/10.1038/srep05880>
- Ellman, G. L. (1959).** Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70- 77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Fausto, N. (2004).** Liver regeneration and repair : Hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology*, 39(6), 1477- 1487. <https://doi.org/10.1002/hep.20214>
- Fougère-Deschatrette, C., Imaizumi-Scherrer, T., Strick-Marchand, H., Morosan, S., Charneau, P., Kremsdorf, D., Faust, D. M., & Weiss, M. C. (2006).** Plasticity of hepatic cell differentiation : Bipotential adult mouse liver clonal cell lines competent

- to differentiate in vitro and in vivo. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(9), 2098- 2109.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0009>
- François, C., Fares, M., Baiocchi, C., & Maixent, J. M. (2015).** Safety of Desmodium adscendens extract on hepatocytes and renal cells. Protective effect against oxidative stress. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(1), 1.
<https://doi.org/10.5455/jice.20141013041312>
- frederic nico, N., Aboudi, E. C. E., Tandjang, M. K., Tchana, A. K., Ngadjui, B., & Moundipa, P. (2013).** Hepatoprotective and antioxidant activities of stem bark extract of Khaya grandifoliola (Welw) CDC and Entada africana Guill. Et Perr. *Journal of Natural Products*, 7, 73- 80.
- frederic nico, N., Fondjo Kouam, A., Kouam, B., Nemg, F., Simo, A., Tchana, P., & Moundipa, P. (2016).** Active chemical fractions of stem bark extract of Khaya grandifoliola C.DC and Entada africana Guill. Et Perr. Synergistically protect primary rat hepatocytes against paracetamol-induced damage. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1169-y>
- Frese, M., Barth, K., Kaul, A., Lohmann, V., Schwärzle, V., & Bartenschlager, R. (2003).** Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor- α . *Journal of General Virology*, 84(5), 1253- 1259. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18997-0>
- Frese, M., Schwärzle, V., Barth, K., Krieger, N., Lohmann, V., Mihm, S., Haller, O., & Bartenschlager, R. (2002).** Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 35(3), 694- 703.
<https://doi.org/10.1053/jhep.2002.31770>
- Galani, Borris R. T., Sahuc, M.-E., Njayou, F. N., Deloison, G., Mkounga, P., Feudjou, W. F., Brodin, P., Rouillé, Y., Nkengfack, A. E., Moundipa, P. F., & Séron, K. (2015).** Plant extracts from Cameroonian medicinal plants strongly inhibit hepatitis C virus infection in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 6, 488.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00488>
- Galani, Borris Rosnay Tietcheu, Sahuc, M.-E., Sass, G., Njayou, F. N., Loscher, C., Mkounga, P., Deloison, G., Brodin, P., Rouillé, Y., Tiegs, G., Séron, K., & Moundipa, P. F. (2016).** *Khaya grandifoliola* C.DC : A potential source of active ingredients against hepatitis C virus *in vitro*. *Archives of Virology*, 161(5), 1169- 1181.
<https://doi.org/10.1007/s00705-016-2771-5>

- Gao, B. Y., Yue, Q. Y., Wang, B. J., & Chu, Y. B. (2003).** Poly-aluminum-silicate-chloride (PASiC)—A new type of composite inorganic polymer coagulant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 229(1), 121- 127. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2003.07.005>
- Gao, K., Helbling, E., Häder, D., & Hutchins, D. (2012).** Responses of marine primary producers to interactions between ocean acidification, solar radiation, and warming. *Marine Ecology Progress Series*, 470, 167. <https://doi.org/10.3354/meps10043>
- Germain, L., Blouin, M. J., & Marceau, N. (1988a).** Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. *Cancer Research*, 48(17), 4909- 4918.
- Germain, L., Blouin, M. J., & Marceau, N. (1988b).** Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. *Cancer Research*, 48(17), 4909- 4918.
- Gissen, P., & Arias, I. M. (2015).** Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of Hepatology*, 63(4), 1023- 1037. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.015>
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949).** Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751- 766.
- Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J., & Rouillé, Y. (2010).** Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology*, 84(2), 773- 787. <https://doi.org/10.1128/JVI.01190-09>
- Graebin, C. S. (2017).** The Pharmacological Activities of Glycyrrhizinic Acid (“Glycyrrhizin”) and Glycyrrhetic Acid. *Sweeteners*, 245- 261. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27027-2_15
- Grippon, P., Cadranel, J. F., & Opolon, P. (1988).** [Primary biliary cirrhosis]. *La Revue De Medecine Interne*, 9(5), 501- 506. [https://doi.org/10.1016/s0248-8663\(88\)80014-6](https://doi.org/10.1016/s0248-8663(88)80014-6)
- Gudjonsson, J. E., Ding, J., Johnston, A., Tejasvi, T., Guzman, A. M., Nair, R. P., Voorhees, J. J., Abecasis, G. R., & Elder, J. T. (2010).** Assessment of the psoriatic transcriptome in a large sample : Additional regulated genes and comparisons with in

- vitro models. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(7), 1829- 1840.
<https://doi.org/10.1038/jid.2010.36>
- Guillouzo, A. (1988).** *Liver Cells and Drugs*. John Libbey Eurotext.
- Gustafsson, J.-E. (1980).** Testing and obtaining fit of data to the Rasch model. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, 33(2), 205- 233.
<https://doi.org/10.1111/j.2044-8317.1980.tb00609.x>
- Han, C.-Y., Sun, T.-T., Xv, G.-P., Wang, S.-S., Gu, J.-G., & Liu, C.-Y. (2019).** Berberine ameliorates CCl₄- induced liver injury in rats through regulation of the Nrf2- Keap1- ARE and p53 signaling pathways. *Molecular Medicine Reports*, 20(4), 3095- 3102. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10551>
- Hernández Marcos, A., Ruiz Felipe, M., Sierra Bergua, B., Rubio Gómez, M., & Sáenz Abad, D. (2016).** [Illness and jaundice. Copalchi toxic hepatitis]. *Semergen*, 42(3), 204- 205. <https://doi.org/10.1016/j.semereg.2015.03.003>
- Hinson, R., Boateng, R., & Madichie, N. (2010).** Corporate social responsibility activity reportage on bank websites in Ghana. *International Journal of Bank Marketing*, 28, 498- 518. <https://doi.org/10.1108/02652321011085176>
- Hou, J., Long, Y., Hu, B., Huang, S., Xu, G., Gao, T., Wu, F., Li, Y., & Wu, Z.-K. (2018).** Retaining mTeSR1 Medium during Hepatic Differentiation Facilitates Hepatocyte-Like Cell Survival by Decreasing Apoptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 51(4), 1533- 1543. <https://doi.org/10.1159/000495644>
- Hu, M., Kurobe, M., Jeong, Y. J., Fuerer, C., Ghole, S., Nusse, R., & Sylvester, K. G. (2007).** Wnt/beta-catenin signaling in murine hepatic transit amplifying progenitor cells. *Gastroenterology*, 133(5), 1579- 1591.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.036>
- Huang, H.-L., Tang, G.-D., Liang, Z.-H., Qin, M.-B., Wang, X.-M., Chang, R.-J., & Qin, H.-P. (2019).** Role of Wnt/ β -catenin pathway agonist SKL2001 in Caerulein-induced acute pancreatitis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 97(1), 15- 22.
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0226>
- Ibis, C., Asenov, Y., Akin, M., Azamat, I. F., Sivrikoz, N., & Gurtekin, B. (2017).** Factors Affecting Liver Regeneration in Living Donors After Hepatectomy. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 23, 5986- 5993. <https://doi.org/10.12659/msm.908136>

- Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D. M., Rai, T. S., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F., Wu, H., Berger, S. L., & Adams, P. D. (2013).** Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *The Journal of Cell Biology*, 202(1), 129- 143. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212110>
- Jaeschke, H. (2015).** Acetaminophen : Dose-Dependent Drug Hepatotoxicity and Acute Liver Failure in Patients. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 33(4), 464- 471. <https://doi.org/10.1159/000374090>
- Jaeschke, H., Gores, G., Cederbaum, A., Hinson, J., Pessayre, D., & Lemasters, J. (2002).** Forum—Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 65, 166- 176. <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.2.166>
- Jaeschke, H., Knight, T. R., & Bajt, M. L. (2003a).** The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology Letters*, 144(3), 279- 288. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(03\)00239-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(03)00239-x)
- Jaeschke, H., Knight, T. R., & Bajt, M. L. (2003b).** The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology Letters*, 144(3), 279- 288. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(03\)00239-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(03)00239-x)
- Jagatia, K., Mehta, J., & Patel, N. (2013).** Low dose ketamine for painless labour- A comparative study of 100 patients. *International Journal of Medical Science and Public Health*, 2(3), 707- 711.
- James, A. P., Watts, G. F., Barrett, P. H. R., Smith, D., Pal, S., Chan, D. C., & Mamo, J. C. L. (2003).** Effect of weight loss on postprandial lipemia and low-density lipoprotein receptor binding in overweight men. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 52(2), 136- 141. <https://doi.org/10.1053/meta.2003.50032>
- Johnson, A. L., Barker, D. G., & Johnston, L. H. (1986).** Induction of yeast DNA ligase genes in exponential and stationary phase cultures in response to DNA damaging agents. *Current Genetics*, 11(2), 107- 112. <https://doi.org/10.1007/BF00378201>
- Kadiiska, M., Gladen, B., Baird, D., Dikalova, A., Sohal, R., Hatch, G., Jones, D., Mason, R., & Barrett, C. (2000).** Biomarkers of oxidative stress study: Are plasma antioxidants markers of CC1(4) poisoning? *Free radical biology & medicine*, 28, 838- 845. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00198-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00198-2)
- Kamiya, A., Kinoshita, T., & Miyajima, A. (2001).** Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Letters*, 492(1- 2), 90- 94. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02140-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02140-8)

- Kamiya, Akihide, & Gonzalez, F. J. (2004).** TNF-alpha regulates mouse fetal hepatic maturation induced by oncostatin M and extracellular matrices. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *40*(3), 527- 536. <https://doi.org/10.1002/hep.20362>
- Kasugai, S., Hasegawa, N., & Ogura, H. (1991).** Application of the MTT Colorimetric Assay to Measure Cytotoxic Effects of Phenolic Compounds on Established Rat Dental Pulp Cells. *Journal of dental research*, *70*, 127- 130. <https://doi.org/10.1177/00220345910700020601>
- Kato, A., Hirokami, Y., Kinami, K., Tsuji, Y., Miyawaki, S., Adachi, I., Hollinshead, J., Nash, R. J., Kiappes, J. L., Zitzmann, N., Cha, J. K., Molyneux, R. J., Fleet, G. W. J., & Asano, N. (2015).** Isolation and SAR studies of bicyclic iminosugars from *Castanospermum australe* as glycosidase inhibitors. *Phytochemistry*, *111*, 124- 131. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.011>
- Kehrer, J. P. (2000).** The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, *149*(1), 43- 50. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00231-6)
- Kelley- Loughnane, N., Sabla, G. E., Ley- Ebert, C., Aronow, B. J., & Bezerra, J. A. (2002).** Independent and overlapping transcriptional activation during liver development and regeneration in mice. *Hepatology*, *35*(3), 525- 534. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.31351>
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002).** Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, *30*(6), 620- 650. <https://doi.org/10.1080/01926230290166724>
- Koike, S. T., Gladders, P., & Paulus, A. O. (2006).** Vegetable diseases : A colour handbook. In *Vegetable Diseases : A Colour Handbook* (p. 449).
- Kordes, C., Sawitza, I., Götze, S., Herebian, D., & Häussinger, D. (2014).** Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(12), 5503- 5515. <https://doi.org/10.1172/JCI74119>
- Krause, P., Saghatolislam, F., Koenig, S., Unthan-Fechner, K., & Probst, I. (2009).** Maintaining hepatocyte differentiation in vitro through co-culture with hepatic stellate cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, *45*(5), 205- 212. <https://doi.org/10.1007/s11626-008-9166-1>
- Krieger, N., Lohmann, V., & Bartenschlager, R. (2001).** Enhancement of Hepatitis C Virus RNA Replication by Cell Culture-Adaptive Mutations. *Journal of Virology*, *75*(10), 4614- 4624. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4614-4624.2001>

- Krishna, K., Mehta, T. A., & Patel, J. A. (2010).** *IN-VITRO HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF JUSTICIA GENDARUSSA STEM ON ISOLATED RAT HEPATOCYTES*. 5.
- Kubo, A., Shinozaki, K., Shannon, J. M., Kouskoff, V., Kennedy, M., Woo, S., Fehling, H. J., & Keller, G. (2004).** Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development (Cambridge, England)*, *131*(7), 1651- 1662. <https://doi.org/10.1242/dev.01044>
- Kumari, A., & Kakkar, P. (2012).** Lupeol prevents acetaminophen-induced in vivo hepatotoxicity by altering the Bax/Bcl-2 and oxidative stress-mediated mitochondrial signaling cascade. *Life Sciences*, *90*(15- 16), 561- 570. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.01.012>
- Lata, J. (2010).** Chronic Liver Diseases as Liver Tumor Precursors. *Digestive Diseases*, *28*(4- 5), 596- 599. <https://doi.org/10.1159/000320057>
- Lemaigre, F. P. (2009).** Mechanisms of liver development : Concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology*, *137*(1), 62- 79. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.035>
- Lerat, H., Berby, F., Trabaud, M. A., Vidalin, O., Major, M., Trépo, C., & Inchauspé, G. (1996).** Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *97*(3), 845- 851. <https://doi.org/10.1172/JCI118485>
- Lim, S., Chase, B., Chevalier, M., & Reimer, P. (2016).** *Lim et al 2016-Pella datasets*.
- Liu, Y., Lu, B., & Peng, J. (2011).** Hepatoprotective activity of the total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit in mice treated by paracetamol. *Food Chemistry*, *125*(2), 719- 725. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.080>
- Loeffler, M., & Roeder, I. (2002).** Tissue Stem Cells : Definition, Plasticity, Heterogeneity, Self-Organization and Models – A Conceptual Approach. *Cells, tissues, organs*, *171*, 8- 26. <https://doi.org/10.1159/000057688>
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., & Bartenschlager, R. (1999).** Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science (New York, N.Y.)*, *285*(5424), 110- 113. <https://doi.org/10.1126/science.285.5424.110>
- Lohmann, Volker, & Bartenschlager, R. (2014).** On the history of hepatitis C virus cell culture systems. *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*(5), 1627- 1642. <https://doi.org/10.1021/jm401401n>

- Loschen, G., Flohé, L., & Chance, B. (1971).** Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Letters*, 18(2), 261- 264. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80459-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80459-3)
- Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I., Teresa, M., Gutiérrez-Salinas, J., Bautista, M., Gonzalez, A., González-rubio, M., Aguilar-Faisal, J., & Morales-González, J. (2014).** Review of natural products with hepatoprotective effects. *World Journal of Gastroenterology*, 28, 14787- 14804. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14787>
- Magielse, J., Arcoraci, T., Breynaert, A., van Dooren, I., Kanyanga, C., Fransen, E., Van Hoof, V., Vlietinck, A., Apers, S., Pieters, L., & Hermans, N. (2013a).** Antihepatotoxic activity of a quantified *Desmodium adscendens* decoction and D-pinitol against chemically-induced liver damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 250- 256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.039>
- Magielse, J., Arcoraci, T., Breynaert, A., van Dooren, I., Kanyanga, C., Fransen, E., Van Hoof, V., Vlietinck, A., Apers, S., Pieters, L., & Hermans, N. (2013b).** Antihepatotoxic activity of a quantified *Desmodium adscendens* decoction and D-pinitol against chemically-induced liver damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 250- 256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.039>
- Marieb, E. N. (1993).** *Anatomie et physiologie humaines* (2e éd). De Boeck.
- Marzioni, M., Glaser, S. S., Francis, H., Phinizy, J. L., LeSage, G., & Alpini, G. (2002).** Functional Heterogeneity of Cholangiocytes. *Seminars in Liver Disease*, 22(3), 227- 240. <https://doi.org/10.1055/s-2002-34501>
- Mathapati, S., Siller, R., Impellizzeri, A. A. R., Lycke, M., Vegheim, K., Almaas, R., & Sullivan, G. J. (2016).** Small-Molecule-Directed Hepatocyte-Like Cell Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 38, 1G.6.1-1G.6.18. <https://doi.org/10.1002/cpsc.13>
- Matsui, T., Kinoshita, T., Morikawa, Y., Tohya, K., Katsuki, M., Ito, Y., Kamiya, A., & Miyajima, A. (2002).** K-Ras mediates cytokine-induced formation of E-cadherin-based adherens junctions during liver development. *The EMBO Journal*, 21(5), 1021- 1030. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.1021>
- Mégarbane, B. (2017).** Intoxication par le paracétamol : Quoi de neuf ? *Médecine Intensive Réanimation*, 26(5), 383- 395. <https://doi.org/10.1007/s13546-017-1300-1>
- Michalopoulos, G. K. (2007).** Liver regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 286- 300. <https://doi.org/10.1002/jcp.21172>

- Mohan, K. H., Pai, S., Rao, R., Sripathi, H., & Prabhu, S. (2008).** Techniques of immunofluorescence and their significance. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 74(4), 415- 419. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.42898>
- Moula, S., Sabitha, K., Jainu, M., & Devi, C. (2004).** Effect of Solanum trilobatum against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats. *The Indian journal of medical research*, 120, 194- 198.
- Nagalakshmi, N., & Prasad, M. N. V. (2001).** Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science*, 160(2), 291–299.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., & Sato, J. (1982).** Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research*, 42(9), 3858- 3863.
- N’gouemo, P., Baldy-Moulinier, M., & Nguemby-Bina, C. (1996a).** Effects of an ethanolic extract of *Desmodium adscendens* on central nervous system in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(2), 77- 83. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01389-x](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01389-x)
- N’gouemo, P., Baldy-Moulinier, M., & Nguemby-Bina, C. (1996b).** Effects of an ethanolic extract of *Desmodium adscendens* on central nervous system in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(2), 77- 83. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01389-x](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01389-x)
- Ninomiya, K., Miyazawa, S., Ozeki, K., Matsuo, N., Muraoka, O., Kikuchi, T., Yamada, T., Tanaka, R., & Morikawa, T. (2016).** Hepatoprotective Limonoids from *Andiroba* (*Carapa guianensis*). *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 591. <https://doi.org/10.3390/ijms17040591>
- Njayou, F. N., Amougou, A. M., Fouemene Tsayem, R., Njikam Manjia, J., Rudraiah, S., Bradley, B., Manautou, J. E., & Fewou Moundipa, P. (2015).** Antioxidant fractions of *Khaya grandifoliola* C.DC. and *Entada africana* Guill. Et Perr. Induce nuclear translocation of Nrf2 in HC-04 cells. *Cell Stress & Chaperones*, 20(6), 991- 1000. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0628-6>
- Noumi, E. (2004).** Animal and plant poisons and their antidotes in Eseka and Mbalmayo regions, Centre Province, Cameroon. *Journal of ethnopharmacology*, 93, 231- 241. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.018>
- Nourjah, P., Ahmad, S. R., Karwoski, C., & Willy, M. (2006).** Estimates of acetaminophen (Paracetomal)-associated overdoses in the United States. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 15(6), 398- 405. <https://doi.org/10.1002/pds.1191>

- Odom, S. L., Vitztum, J., Wolery, R., Lieber, J., Sandall, S., Hanson, M. J., Beckman, P., Schwartz, I., & Horn, E. (2004).** Preschool inclusion in the United States : A review of research from an ecological systems perspective. *Journal of Research in Special Educational Needs*, 4(1), 17- 49. <https://doi.org/10.1111/J.1471-3802.2004.00016.x>
- Oertel, M., & Shafritz, D. A. (2008).** STEM CELLS, CELL TRANSPLANTATION AND LIVER REPOPULATION. *Biochimica et biophysica acta*, 1782(2), 61- 74. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.12.004>
- Oh, S.-H., Swiderska-Syn, M., Jewell, M. L., Premont, R. T., & Diehl, A. M. (2018).** Liver regeneration requires Yap1-TGF β -dependent epithelial-mesenchymal transition in hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 69(2), 359- 367. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.05.008>
- Omar, H., Mohamed, W., Arab, H., & Arafa, E.-S. (2016).** Tangeretin Alleviates Cisplatin-Induced Acute Hepatic Injury in Rats : Targeting MAPKs and Apoptosis. *PloS one*, 11, e0151649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151649>
- OMS hepatitis. (2020).** *Hepatitis*. <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/hepatitis>
- Ortega-Alonso, A., & Andrade, R. J. (2018).** Chronic liver injury induced by drugs and toxins. *Journal of Digestive Diseases*, 19(9), 514- 521. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12612>
- Otrubová, O., Turecký, L., Uličná, O., Janega, P., Luha, J., & Muchová, J. (2018).** Therapeutic effects of N-acetyl-L-cysteine on liver damage induced by long-term CCl₄ administration. *General Physiology and Biophysics*, 37(1), 23- 31. https://doi.org/10.4149/gpb_2017016
- Ouattara, Y., Sakandé, B., Simporé, J., & Kaboré, I. Z. (2003).** EVALUATION DE L'ACTIVITE HEPATOPROTECTRICE DES EXTRAITS AQUEUX DE PLANTES MEDICINALES FACE A UNE HEPATOTOXICITE LETALE INDUITE CHEZ LA SOURIS. 001, 26.
- Pang, C., Zheng, Z., Shi, L., Sheng, Y., Wei, H., Wang, Z., & Ji, L. (2015).** Caffeic acid prevents acetaminophen-induced liver injury by activating the Keap1-Nrf2 antioxidative defense system. *Free Radical Biology and Medicine*, 91. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.024>
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., & Caparrini, A. (1986).** Sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 154, 536- 541. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)

- Paracha, U. Z., Fatima, K., Alqahtani, M., Chaudhary, A., Abuzenadah, A., Damanhour, G., & Qadri, I. (2013).** Oxidative stress and hepatitis C virus. *Virology Journal*, *10*, 251. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-251>
- Pawlotsky, J.-M. (2013).** NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *Journal of hepatology*, *59*(2), 375–382.
- Peng, H., Wisse, E., & Tian, Z. (2016).** Liver natural killer cells : Subsets and roles in liver immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, *13*(3), 328- 336. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.96>
- Pereira, A. A., & Jacobson, I. M. (2009).** New and experimental therapies for HCV. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *6*(7), 403- 411. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2009.92>
- Polyak, S. J., Oberlies, N. H., Pécheur, E.-I., Dahari, H., Ferenci, P., & Pawlotsky, J.-M. (2013).** Silymarin for hepatitis C virus infection. *Antiviral therapy*, *18*(2), 141.
- Pothier, J., Ragot, J., & Galand, N. (2006a).** Planar chromatographic study of flavonoids and soyasaponins for validation of fingerprints of *Desmodium adscendens* of different origin. *Jpc-journal of Planar Chromatography-modern Tlc - JPC-J PLANAR CHROMAT-MOD TLC*, *19*, 191- 194. <https://doi.org/10.1556/JPC.19.2006.3.3>
- Pothier, J., Ragot, J., & Galand, N. (2006b).** Planar chromatographic study of flavonoids and soyasaponins for validation of fingerprints of *Desmodium adscendens* of different origin. *Jpc-journal of Planar Chromatography-modern Tlc - JPC-J PLANAR CHROMAT-MOD TLC*, *19*, 191- 194. <https://doi.org/10.1556/JPC.19.2006.3.3>
- Pratibha, R., Sameer, R., Rataboli, P. V., Bhiwgade, D. A., & Dhume, C. Y. (2006).** Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats. *European Journal of Pharmacology*, *532*(3), 290- 293. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.01.007>
- Pu, W., Zhang, H., Huang, X., Tian, X., He, L., Wang, Y., Zhang, L., Liu, Q., Li, Y., Li, Y., Zhao, H., Liu, K., Lu, J., Zhou, Y., Huang, P., Nie, Y., Yan, Y., Hui, L., Lui, K. O., & Zhou, B. (2016).** Mfsd2a+ hepatocytes repopulate the liver during injury and regeneration. *Nature Communications*, *7*, 13369. <https://doi.org/10.1038/ncomms13369>
- Rallis, G., Koletsa, T., Saridaki, Z., Manousou, K., Koliou, G.-A., Kostopoulos, I., Kotoula, V., Makatsoris, T., Kourea, H. P., Raptou, G., Chrisafi, S., Samantas, E., Papaparaskava, K., Pazarli, E., Papakostas, P., Kafiri, G., Mauri, D., Papoudou-Bai, A., Christodoulou, C., ... Fountzilias, G. (2019).** Association of

- Notch and Hedgehog Pathway Activation With Prognosis in Early-stage Colorectal Cancer. *Anticancer Research*, 39(4), 2129- 2138. <https://doi.org/10.21873/anticanres.13326>
- Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2018).** Acetaminophen Toxicity : Novel Insights Into Mechanisms and Future Perspectives. *Gene Expression*, 18(1), 19- 30. <https://doi.org/10.3727/105221617X15084371374138>
- Rastogi, S. K., Pal, P., Aston, D. E., Bitterwolf, T. E., & Branen, A. L. (2011).** 8-Aminoquinoline Functionalized Silica Nanoparticles : A Fluorescent Nanosensor for Detection of Divalent Zinc in Aqueous and in Yeast Cell Suspension. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(5), 1731- 1739. <https://doi.org/10.1021/am2002394>
- Recknagel, R. O., Glende, E. A., Dolak, J. A., & Waller, R. L. (1989).** Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 43(1), 139- 154. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(89\)90050-8](https://doi.org/10.1016/0163-7258(89)90050-8)
- Reed, D. J. (1990).** Glutathione : Toxicological implications. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 30(1), 603–631.
- Rocco, A., Compare, D., Angrisani, D., Sanduzzi Zamparelli, M., & Nardone, G. (2014).** Alcoholic disease : Liver and beyond. *World Journal of Gastroenterology*, 20(40), 14652- 14659. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14652>
- Rothuizen, J. (2009).** Important clinical syndromes associated with liver disease. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 39(3), 419- 437. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.02.007>
- Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A. H., Maertens, G., Wakita, T., Wychowski, C., & Dubuisson, J. (2006).** Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology*, 80(6), 2832- 2841. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.6.2832-2841.2006>
- Rubinstein, D. (1962).** Epinephrine release and liver glycogen levels after carbon tetrachloride administration. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 203(6), 1033- 1037. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1962.203.6.1033>
- Sandberg, F. B., Emmans, G. C., & Kyriazakis, I. (2005).** Partitioning of limiting protein and energy in the growing pig : Description of the problem, possible rules and their qualitative evaluation. *British Journal of Nutrition*, 93(2), 205- 212. <https://doi.org/10.1079/BJN20041321>

- Sanz-Biset, J., Campos-de-la-Cruz, J., Epiqui n-Rivera, M. A., & Ca nigueral, S. (2009).** A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). *Journal of Ethnopharmacology*, *122*(2), 333- 362. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.009>
- Sarkar, S., Dalgaard, J. Z., Millar, J. B. A., & Arumugam, P. (2014).** The Rim15-endosulfine-PP2Acdc55 signalling module regulates entry into gametogenesis and quiescence via distinct mechanisms in budding yeast. *PLoS Genetics*, *10*(6), e1004456. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004456>
- Sarrazin, C., Berg, T., Ross, R. S., Schirmacher, P., Wedemeyer, H., Neumann, U., Schmidt, H. H., Spengler, U., Wirth, S., & Kessler, H. H. (2010).** Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis C virus (HCV) infection : The German guidelines on the management of HCV infection. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, *48*(2), 289.
- Sarrazin, C., & Zeuzem, S. (2010).** Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, *138*(2), 447–462.
- Schaefer, M., & Mauss, S. (2008).** Hepatitis C treatment in patients with drug addiction : Clinical management of interferon-alpha-associated psychiatric side effects. *Current drug abuse reviews*, *1*(2), 177–187.
- Schnackenberg, L. K., Chen, M., Sun, J., Holland, R. D., Dragan, Y., Tong, W., Welsh, W., & Beger, R. D. (2009).** Evaluations of the trans-sulfuration pathway in multiple liver toxicity studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *235*(1), 25- 32. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.11.015>
- Schroeder, I. S., Sulzbacher, S., Nolden, T., Fuchs, J., Czarnota, J., Meisterfeld, R., Himmelbauer, H., & Wobus, A. M. (2012).** Induction and selection of Sox17-expressing endoderm cells generated from murine embryonic stem cells. *Cells, Tissues, Organs*, *195*(6), 507- 523. <https://doi.org/10.1159/000329864>
- Shah, M., & Allegrucci, C. (2013).** Stem Cell Plasticity in Development and Cancer : Epigenetic Origin of Cancer Stem Cells. *Sub-cellular biochemistry*, *61*, 545- 565. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4_24
- Shang, H., Wang, Z., & Song, Y. (2016).** Liver progenitor cells-mediated liver regeneration in liver cirrhosis. *Hepatology International*, *10*(3), 440- 447. <https://doi.org/10.1007/s12072-015-9693-2>
- Shepard, C. W., Finelli, L., & Alter, M. J. (2005).** Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet. Infectious Diseases*, *5*(9), 558- 567. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70216-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70216-4)

- Shyamal, S., Latha, P. G., Suja, S. R., Shine, V. J., Anuja, G. I., Sini, S., Pradeep, S., Shikha, P., & Rajasekharan, S. (2010).** Hepatoprotective effect of three herbal extracts on aflatoxin B1-intoxicated rat liver. *Singapore Medical Journal*, *51*(4), 326- 331.
- Sies, H. (1993).** Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry*, *215*(2), 213–219.
- Sies, H. (2000).** What is oxidative stress? In *Oxidative stress and vascular disease* (p. 1–8). Springer.
- Sinha, A. K. (1972).** Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*, *47*(2), 389- 394. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90132-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90132-7)
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P., & Duncan, S. A. (2010a).** Organogenesis and Development of the Liver. *Developmental Cell*, *18*(2), 175- 189. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.011>
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P., & Duncan, S. A. (2010b).** Organogenesis and development of the liver. *Developmental Cell*, *18*(2), 175- 189. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.011>
- Smedsrod, B., De Bleser, P. J., Braet, F., Lovisetti, P., Vanderkerken, K., Wisse, E., & Geerts, A. (1994).** Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut*, *35*(11), 1509- 1516. <https://doi.org/10.1136/gut.35.11.1509>
- Squires, J. E., & McKiernan, P. (2018).** Molecular Mechanisms in Pediatric Cholestasis. *Gastroenterology Clinics of North America*, *47*(4), 921- 937. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2018.07.014>
- Ssegawa, P., & Kasenene, J. (2007).** Medicinal plant diversity and uses in the Sango bay area, Southern Uganda. *Journal of ethnopharmacology*, *113*, 521- 540. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.014>
- Steinmann, E., & Pietschmann, T. (2013).** Cell culture systems for hepatitis C virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *369*, 17- 48. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_2
- Storz, G., & Imlay, J. A. (1999).** Oxidative stress. *Current opinion in microbiology*, *2*(2), 188–194.
- Strober, W. (1997).** Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, *21*(1), A.3B.1-A.3B.2. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>

- Su, X. Y., Wang, Z. Y., & Liu, J. R. (2009).** In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. *FOOD CHEMISTRY*, *117*(4), 681- 686.
- Suzuki, A., Iwama, A., Miyashita, H., Nakauchi, H., & Taniguchi, H. (2003).** Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development (Cambridge, England)*, *130*(11), 2513- 2524. <https://doi.org/10.1242/dev.00459>
- Tan, X., Behari, J., Cieply, B., Michalopoulos, G. K., & Monga, S. P. S. (2006).** Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration. *Gastroenterology*, *131*(5), 1561- 1572. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.042>
- Tan, X., Yuan, Y., Zeng, G., Apte, U., Thompson, M. D., Cieply, B., Stolz, D. B., Michalopoulos, G. K., Kaestner, K. H., & Monga, S. P. S. (2008).** Beta-catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *47*(5), 1667- 1679. <https://doi.org/10.1002/hep.22225>
- Tardif, K. D., Waris, G., & Siddiqui, A. (2005).** Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. *Trends in Microbiology*, *13*(4), 159- 163. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.02.004>
- Thomson, R. K., & Arthur, M. J. (1999).** Mechanisms of liver cell damage and repair. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, *11*(9), 949- 955. <https://doi.org/10.1097/00042737-199909000-00002>
- Trout, A. T., Towbin, A. J., Smith, E. A., Gupta, A., & Dillman, J. R. (2018).** Hepatocyte-specific contrast media: Not so simple. *Pediatric Radiology*, *48*(9), 1245- 1255. <https://doi.org/10.1007/s00247-018-4108-x>
- Tsuji, Y., Takano, M., & Kubota, I. (1994).** [Hemorrhoid]. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine, Suppl 6*, 855- 857.
- Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., Koyasu, S., Nishikawa, T., & Amagai, M. (2003).** Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *170*(4), 2170- 2178. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.2170>
- Tubéry, P., Ragot, J., Lagarde, P., Authier-Derivaux, D., Pidoux, M., Rasolohery, C., & Bourdy, G. (2015).** *Desmodium adscendens*. De l'usage traditionnel camerounais

- contre les hépatites à l'accompagnement des chimiothérapies. *HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale*. <https://doi.org/10.4267/2042/57914>
- Vallée, A. (2018).** [Aerobic glycolysis activation through canonical WNT/ β -catenin pathway in ALS]. *Medecine Sciences: M/S*, 34(4), 326- 330. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183404013>
- Van der Vlies, D., Woudenberg, J., & Post, J. A. (2003).** Protein oxidation in aging : Endoplasmic reticulum as a target. *Amino Acids*, 25(3- 4), 397- 407. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0025-9>
- Van der Vlies, Dennis, Makkinje, M., Jansens, A., Braakman, I., Verkleij, A. J., Wirtz, K. W. A., & Post, J. A. (2003).** Oxidation of ER resident proteins upon oxidative stress : Effects of altering cellular redox/antioxidant status and implications for protein maturation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 5(4), 381- 387. <https://doi.org/10.1089/152308603768295113>
- Vargas-Mendoza, N. (2014).** Hepatoprotective effect of silymarin. *World Journal of Hepatology*, 6(3), 144. <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i3.144>
- Varshney, R. K., Chen, W., Li, Y., Bharti, A. K., Saxena, R. K., Schlueter, J. A., Donoghue, M. T. A., Azam, S., Fan, G., Whaley, A. M., Farmer, A. D., Sheridan, J., Iwata, A., Tuteja, R., Penmetsa, R. V., Wu, W., Upadhyaya, H. D., Yang, S.-P., Shah, T., ... Jackson, S. A. (2012).** Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. *Nature Biotechnology*, 30(1), 83- 89. <https://doi.org/10.1038/nbt.2022>
- Vieyres, G., & Pietschmann, T. (2013).** Entry and replication of recombinant hepatitis C viruses in cell culture. *Methods (San Diego, Calif.)*, 59(2), 233- 248. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.09.005>
- Vitaglione, P., Morisco, F., Caporaso, N., & Fogliano, V. (2004).** Dietary antioxidant compounds and liver health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7- 8), 575- 586. <https://doi.org/10.1080/10408690490911701>
- Wahyuni, T. S., Tumewu, L., Permanasari, A. A., Apriani, E., Adianti, M., Rahman, A., Widawaruyanti, A., Lusida, M. I., Fuad, A., & Fuchino, H. (2013).** Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus. *Virology journal*, 10(1), 259.
- Wang, T.-S., Lin, C.-P., Chen, Y.-P., Chao, M.-R., Li, C.-C., & Liu, K.-L. (2018).** CYP450-mediated mitochondrial ROS production involved in arecoline N-oxide-

- induced oxidative damage in liver cell lines. *Environmental Toxicology*, 33(10), 1029- 1038. <https://doi.org/10.1002/tox.22588>
- Wang, X., Li, X., Wang, T., Wu, S.-P., Jeong, J.-W., Kim, T. H., Young, S. L., Lessey, B. A., Lanz, R. B., Lydon, J. P., & DeMayo, F. J. (2018).** SOX17 regulates uterine epithelial-stromal cross-talk acting via a distal enhancer upstream of *Ihh*. *Nature Communications*, 9(1), 4421. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06652-w>
- Weinstein, M., Monga, S. P., Liu, Y., Brodie, S. G., Tang, Y., Li, C., Mishra, L., & Deng, C. X. (2001).** Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development. *Molecular and Cellular Biology*, 21(15), 5122- 5131. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.15.5122-5131.2001>
- Wilbur, K. M., Bernheim, F., & Shapiro, O. W. (1949).** The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Archives of Biochemistry*, 24(2), 305- 313.
- Woerz, I., Lohmann, V., & Bartenschlager, R. (2009).** Hepatitis C virus replicons : Dinosaurs still in business? *Journal of Viral Hepatitis*, 16(1), 1- 9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.01066.x>
- Wu, X.-Q., Wang, Y.-Q., Xu, S.-M., Liu, J.-F., Bi, X.-Y., Wang, Z.-Q., & Zhang, J.-P. (2017).** The WNT/ β -catenin signaling pathway may be involved in granulosa cell apoptosis from patients with PCOS in North China. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 46(1), 93- 99. <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2015.08.013>
- Xiao, Q., Komori, H., & Lee, C.-Y. (2012).** Klumpfuss distinguishes stem cells from progenitor cells during asymmetric neuroblast division. *Development*, 139(15), 2670- 2680. <https://doi.org/10.1242/dev.081687>
- Xu, Y., & Zhong, J. (2016).** Innate immunity against hepatitis C virus. *Current Opinion in Immunology*, 42, 98- 104. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.06.009>
- Yen, J.-Y., Chen, C.-S., Wang, P.-W., Chang, Y.-H., & Ko, C.-H. (2011).** Social Anxiety in Online and Real-Life Interaction and Their Associated Factors. *Cyberpsychology, behavior and social networking*, 15, 7- 12. <https://doi.org/10.1089/cyber.2011.0015>
- Yu, H.-P., Qi, S.-T., Feng, W.-F., Zhang, G.-Z., Zhang, H.-P., & Tian, J.-J. (2015).** Interference of Notch 2 inhibits the progression of gliomas and induces cell apoptosis by induction of the cell cycle at the G0/G1 phase. *Molecular Medicine Reports*, 11(1), 734- 738. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2747>

- Zaidi, A. A., White, J. D., Mattern, B. C., Liebowitz, C. R., Puts, D. A., Claes, P., & Shriver, M. D. (2019).** Facial masculinity does not appear to be a condition-dependent male ornament and does not reflect MHC heterozygosity in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(5), 1633- 1638. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808659116>
- Zengin, G., Cakmak, Y. S., Guler, G. O., & Aktumsek, A. (2010).** In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia region of Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(10), 2638- 2641. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.033>
- Zhang, Z., Gong, Y., Guo, Y., Hai, Y., Yang, H., Yang, S., Liu, Y., Ma, M., Liu, L., Li, Z., Gao, W.-Q., & He, Z. (2013).** Direct transdifferentiation of spermatogonial stem cells to morphological, phenotypic and functional hepatocyte-like cells via the ERK1/2 and Smad2/3 signaling pathways and the inactivation of cyclin A, cyclin B and cyclin E. *Cell Communication and Signaling: CCS*, *11*, 67. <https://doi.org/10.1186/1478-NO811X-11-67>
- Zorn, A. M. (2008a).** Liver development. In *StemBook*. Harvard Stem Cell Institute. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27068/>
- Zorn, A. M. (2008b).** Liver development. In *StemBook*. Harvard Stem Cell Institute. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27068/>
- Zou, Y., Fang, F., Ding, Y.-J., Dai, M.-Y., Yi, X., Chen, C., Tao, Z.-Z., & Chen, S.-M. (2016).** Notch 2 signaling contributes to cell growth, anti-apoptosis and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, *14*(4), 3517- 3524. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5688>

Webographie

- Anatomie et physiologie humaine Edition 1999—Broché—Elaine N. Marieb—Achat Livre | fnac.* (s. d.). Consulté 23 août 2020, à l'adresse <https://livre.fnac.com/a899291/Elaine-N-Marieb-Anatomie-et-physiologie-humaine>
- Reitman-Frankel Colorimetric Transaminase Procedure in Suspected Myocardial Infarction | Clinical Chemistry | Oxford Academic.* (s. d.). Consulté 5 juillet 2020, à l'adresse <https://academic.oup.com/clinchem/article-abstract/13/6/482/5674518?redirectedFrom=PDF>

ANNEXES

Annexe 1

❖ Dosage des protéines

- Solution de Sérum Albumine Bovin (SAB) 0,5 mg/ml (10ml) (à préparer au moment de la manipulation).
- Réactif de Bradford

Réactif Stock

- Peser 0,25 g de bleu de Coomassie G-250
- Dissoudre dans 25 ml d'éthanol 95°
- Ajouter H₃PO₄ 85%, qsq 100ml
- Mélanger et conserver au réfrigérateur à 4°C

Solution de travail (réactif de Bradford proprement dit) (500ml).

- Pipeter 12,5 ml de réactif stock
- Ajouter 50 ml de H₃PO₄ 85%
- Ajouter 36 ml d'éthanol 95°
- Mélanger et conserver au réfrigérateur à 4°C

❖ Dosage de protéines sériques et hépatiques

- Solution de SAB 5 mg/ml (10 ml) (à préparer au moment de la manipulation)
- Solution de NaCl 0,9% (250 ml)
 - Peser 2,25 g de NaCl
 - Dissoudre dans de l'eau distillée, qsp 250 ml
- Réactif du Biuret (1000 ml)

Solution A

- Peser 1,5 g de CuSO₄, 5H₂O
- Peser 6 g de Tartrate double de sodium et potassium
- Peser 1 g de KI
- Dissoudre dans de l'eau distillée, qsp 500 ml

Solution B

- Peser 30 g de NaOH
- Dissoudre dans de l'eau distillée qsp 300 ml

Mélanger A et B compléter le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée.

❖ **Dosage colorimétrique de l'ALAT**

- Tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 (tampon de travail)

Solution A

- Peser 8,7g de K_2HPO_4
- Dissoudre dans de l'eau distillée, qsp 500 ml

Solution B

- Peser 1,36 g de KH_2PO_4
- Dissoudre dans de l'eau distillée, qsp 100 ml

Ajuster le pH de la solution A à 7,4 à l'aide de la solution B

- NaOH 1 N
- NaOH 0,4N
- Substrat ALAT (50 ml)
 - Peser 0,015 g de α - cétooglutarate
 - Peser 0,89 g d'alamine
 - Dissoudre dans le tampon de travail qsp 50 ml
- Solution de 2,4 - dinitrophénylhydrazine 0,2% (100 ml)
 - Peser 0,02 g de 2,4-DNPH
 - Dissoudre en chauffant à une température inférieure à 70°C dans 8 ml de HCl 37%
 - Ajouter de l'eau distillée, qsp 100 ml
- Solution mère étalon de pyruvate à 2,20 g/l (10 ml)
- Solution étalon de pyruvate 0,22g/l (10 ml) (à préparer le jour de la manipulation)
 - Pipeter 1 ml de solution mère de pyruvate étalon
 - Ajouter 9 ml de tampon de travail
- Solution de NaCl 0,9%

❖ **Dosage colorimétrique de l'ASAT**

- Tampon phosphate 0,1M pH 7,4 (tampon de travail)

- Solution de NaOH 1N
- Solution de NaOH 0,4N
- Solution d'acide phosphorique diluée au 1/10 (H₃PO₄ 8,5%)
 - Pipeter 2 ml d'acide phosphorique 85%
 - Ajouter 18 ml d'eau distillée
- Solution de 2,4 - DNPH 0,2%
- Solution mère étalon de pyruvate 2,20 g/l
- Solution fille étalon de pyruvate 0,22g/l
- Solution de NaCl 0,9%
- Substrat ASAT (50 ml)
 - Peser 0,015 g d' α - cétoglutarate
 - Peser 1,33 g d'acide aspartique
 - Pipeter 12,5 ml de NaOH 1N
 - Dissoudre et ajuster le pH à 7,4 avec acide phosphorique 8,5%
 - Ajouter tampon de travail, qsp 50 ml

❖ **Dosage enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL)** (à préparer le jour de la manipulation)

- Kit SIGMA DIAGNOSTIC

Dissoudre le contenu de chaque flacon dans 10 ml d'eau distillée.

❖ **Dosage du dialdéhyde malonique (MDA)**

- HCl 2M
- Tampon Tris - HCl 50mM pH 7,4 contenant du KCl 150mM (500 ml)
 - Peser 3,03 g de Tris
 - Peser 5,59 g de KCl
 - Dissoudre dans 300 ml d'eau distillée
 - Ajuster le pH à 7,4 avec HCl 2M
 - Compléter le volume à 500 ml avec de l'eau distillée
- TCA 20%
- TBA 0,67%

❖ **Dosage glutathion (GSH)**

- Tampon phosphate 0,1 M pH 6,5

Solution A

- Peser 4,35 g de K_2HPO_4
- Dissoudre dans de l'eau distillée, qsp 250 ml

Solution B

- Peser 3,4 g de KH_2PO_4
- Dissoudre dans de l'eau distillée, qsp 250 ml

Ajuster le pH de la solution B à 7,4 à l'aide de la solution A

- Tampon Tris - HCl 50 mM pH 7,4 contenant du KCl 150 mM
- Réactif d'ELLMAN (250 ml)
 - Peser 4,96 mg d'acide 2,2 - dithio -5,5'-dibenzoïque (DTNB)
 - Dissoudre dans Tampon Phosphate 0,1M pH 6,5 qsp 250 ml

❖ **Préparation d'autres solutions**

- **Ethanol à 30 °, 70 ° et 80 °**

La préparation des concentrations respectives a été faite à partir de l'éthanol 95 ° à l'aide des volumes de dilution de l'abaque de Gay Lussac.

- **Liquide de Bouin**

Afin de préparer 105 mL de liquide de Bouin, 75 mL d'acide picrique ont été mélangés avec 25 mL de formol 37 % et 5 mL d'acide acétique.

- **Solution de peroxyde d'hydrogène 0,5 % en méthanol**

Afin de préparer la solution de peroxyde d'hydrogène 0,5 % en méthanol, 3,5 mL de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 30 % ont été homogénéisés avec 177 mL de méthanol (CH_3OH).

- **Normal Horse Serum à 10 %**

Pour la préparation du *Normal Horse Serum* (NHsS) à 10 %, 0,1 mL de NHsS a été homogénéisé dans 0,9 mL de TBS (voir préparation des tampons).

– **Solution des anticorps primaires SOx-17 1/200 en 1 % NGS**

La solution de l'anticorps primaire Sox-17 (H-130) 1/200 en 1 % NGS a été préparée en diluant 5 µL de l'anticorps avec 0,995 mL de NGS à 1 %.

– **Solution de l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin IgG-FITC 1/200 en NGS à 1 %**

La solution de l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin IgG-FITC 1/200 en NGS à 1 % a été préparée en diluant cet anticorps au 1/200e en mélangeant 5 µL de l'anticorps avec 0,995 mL de NGS à 1 % à l'abri de la lumière.

❖ **Préparation des autres solutions tampons**

– **Formaldéhyde 10 % tamponné**

Afin de préparer un litre de formol 10 % tamponné, 6,5 g de phosphate disodique et 4 g de phosphate monosodique ont été dissous dans le formol commercial (37 %) à l'aide d'un agitateur magnétique sous hotte ventilée. Par la suite, 900 mL d'eau distillée ont été ajoutée à la solution obtenue.

– **Tampon carbonate 0,05 M ; pH 10,2**

Le tampon carbonate 0,05 M ; pH 10,2 a été préparé en pesant dans l'ordre dans un bécher 4,5 g de carbonate de sodium ($\text{Na}_2\text{CO}_3, 10\text{H}_2\text{O}$) et 4,2 g de bicarbonate de sodium (NaHCO_3). L'ensemble est solubilisé dans 900 mL d'eau distillée. Le pH de la solution a été titré à 10,2 avec la soude et le volume a été complété à 1000 mL avec de l'eau distillée.

– **Tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,5**

Pour préparer le tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,5, 8,91 g de phosphate disodique hydraté ont été dissous dans 500 mL d'eau distillée et 6,5 g de phosphate monosodique hydraté ont été dissous dans 500 mL d'eau distillée. A 500 mL de la solution de phosphate disodique hydraté ont été ajoutés 70 mL de la solution de phosphate monosodique hydraté, puis goutte à goutte 30 mL de la même solution, pour un volume final d'environ 600 mL de tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,5.

– **Tampon phosphate 0,1 M ; pH 6,5**

Le tampon phosphate 0,1 M ; pH 6,5 a été préparé en dissolvant d'une part 8,9 g de phosphate disodique hydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, \text{H}_2\text{O}$) dans 500 mL d'eau distillée et d'autre part 6,5 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$) dans 50 mL d'eau distillée. A 500 mL de la solution de phosphate mono sodique hydraté ont été ajoutés 200 mL de phosphate monosodique, puis goutte à goutte 80 mL de la même solution ; pour un volume final d'environ 780 mL de tampon phosphate 0,1 M ; pH 6,5.

– **Tampon Tris 50 mM ; pH 7,4**

Pour préparer le tampon Tris- NaHPO_4 50 mM, 1,21 g de Tris base et 2,79 g de KCl ont été pesés et dissous dans 250 mL d'eau distillée. Le pH a été ajusté à 7,4 par ajout de l'acide chlorhydrique concentré et le volume a été complété à 500 mL avec de l'eau distillée.

– **Tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,4**

Pour préparer le tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,4, 22,94 g de phosphate disodique hydraté ont été dissous dans 500 mL d'eau distillée et 4,6 g de phosphate monosodique hydraté ont été dissous dans 500 mL d'eau distillée. A 500 mL de la solution de phosphate disodique hydraté ont été ajoutés 70 mL de la solution de phosphate monosodique hydraté, puis goutte à goutte 30 mL de la même solution, pour un volume final d'environ 600 mL de tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,4.

– **Tampon Phosphate Salin**

Pour préparer le Tampon Phosphate Salin (Phosphate Buffered Saline = PBS), 9 g de NaCl ont été solubilisés dans 1000 mL de Tampon Phosphate 0,1 M, pH 7,4.

– **Tampon Phosphate Salin/0,2 % Triton X**

Pour préparer le Tampon Phosphate Salin/ 0,2 % Triton X, 0,2 mL de Triton X a solubilisé dans 99,8 mL de PBS.

– **Tampon Tris 0,5 M ; pH 7,6**

Afin de préparer ce tampon, 60,55 g de Tris base ont été dissous dans 500 mL d'eau distillée. Le pH de la solution a ensuite été ajusté à 7,6 avec de l'acide chlorhydrique concentré puis l'eau distillée a été ajoutée en quantité suffisante pour faire un litre.

– **Tampon Tris salin**

Pour préparer le tampon Tris salin (Tris Buffered Saline = TBS), 100 mL du tampon Tris 0,5 M ; pH 7,6 ont été mélangés à 900 mL de chlorure de sodium 0,9 %.

– **Tampon citrate de sodium 10 Mm ; pH 6**

Deux solutions ont été nécessaires. La solution A a été obtenue en dissolvant 21 g d'acide citrique avec de l'eau distillée en quantité suffisante pour faire 1 litre. La solution B quant à elle a été préparée en dissolvant 29,44 g de citrate de sodium avec de l'eau distillée en quantité suffisante pour faire 1 litre. 9 mL de la solution A ont été mélangés à 41 mL de la solution B puis le volume a été complété à 500 mL avec de l'eau distillée.

Annexe 2 : Etalonnages

– Dosage des protéines (BRADFORD, 1976)

Tableau a : Gamme de dilution de la SAB (0,5mg /ml)

Tubes	1	2	3	4	5
Solutions					
SAB (0,5mg/ml) (µl)	100	200	300	400	500
Eau distillée (ED) (µl)	1900	1800	1700	1600	1500
Solution S = SAB + ED	2000	2000	2000	2000	2000
Mélanger et prélever un volume V pour étalonnage					

Tableau b : Etalonnage des protéines par la SAB (0,5mg /ml)

Tubes	0	1	2	3	4	5
Solutions						
Solution S ^a (µl)	0	50	50	50	50	50
Eau distillée (µl)	50	-	-	-	-	-
Réactif de Bradford (µl)	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Mélanger et incubé à 25°C pendant 10 minutes et lire la densité optique (DO)						
DO à 595 nm	0,000	0,024	0,053	0,76	0,096	0,116
		0,023	0,055	0,078	0,100	0,116
		0,024	0,050	0,078	0,098	0,115
DO Moyenne	0,000	0,024	0,053	0,077	0,098	0,116
Quantité de protéines (µg)	0	1,25	2,50	3,75	5,00	6,25
Concentration en protéines (ng/ml)	0	1,25	5	11,25	20	31,25

^a La solution S est celle obtenue précédemment (Tableau 2a)

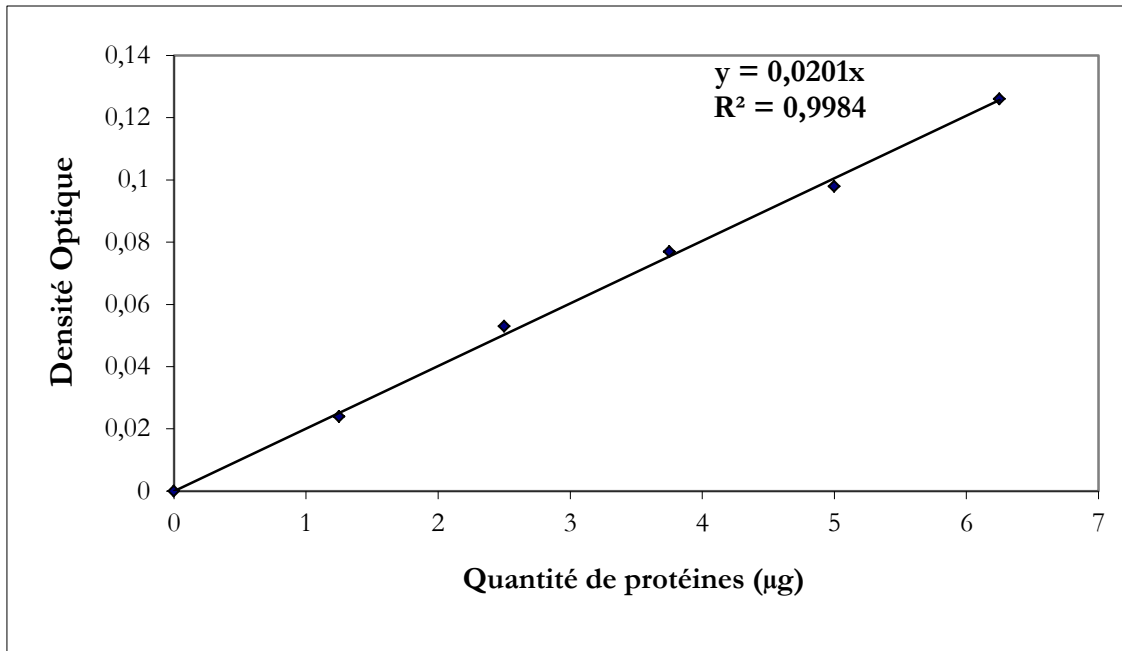


Figure a : Courbe d'étalonnage des protéines à 595 nm

Dosage par la méthode de Bradford (BRADFORD *et al.*, 1976)

Etalon : SAB (0,5 mg/ml)

– Dosage des protéines sérique et hépatique (GORNALL *et al.*, 1949)

Tableau c : Etalonnage des protéines par le SAB 5 mg/ml

Solutions	Tubes	0	1	2	3	4	5
SAB (5mg/ml) (ml)		0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
NaCl 0,9% (ml)		3	2,9	2,8	2,7	2,6	2,5
Réactif du Biuret (ml)		3	3	3	3	3	3
Mélanger et lire la densité optique à 540 nm après 20 minutes							
DO à 550 nm	0,000	0,025	0,052	0,079	0,103	0,127	
		0,024	0,051	0,076	0,104	0,128	
DO Moyenne	0,000	0,025	0,052	0,078	0,104	0,128	
Quantité de protéines (mg)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	
Concentration en protéines (mg/ml)	0	0,17	0,33	0,50	0,67	0,83	

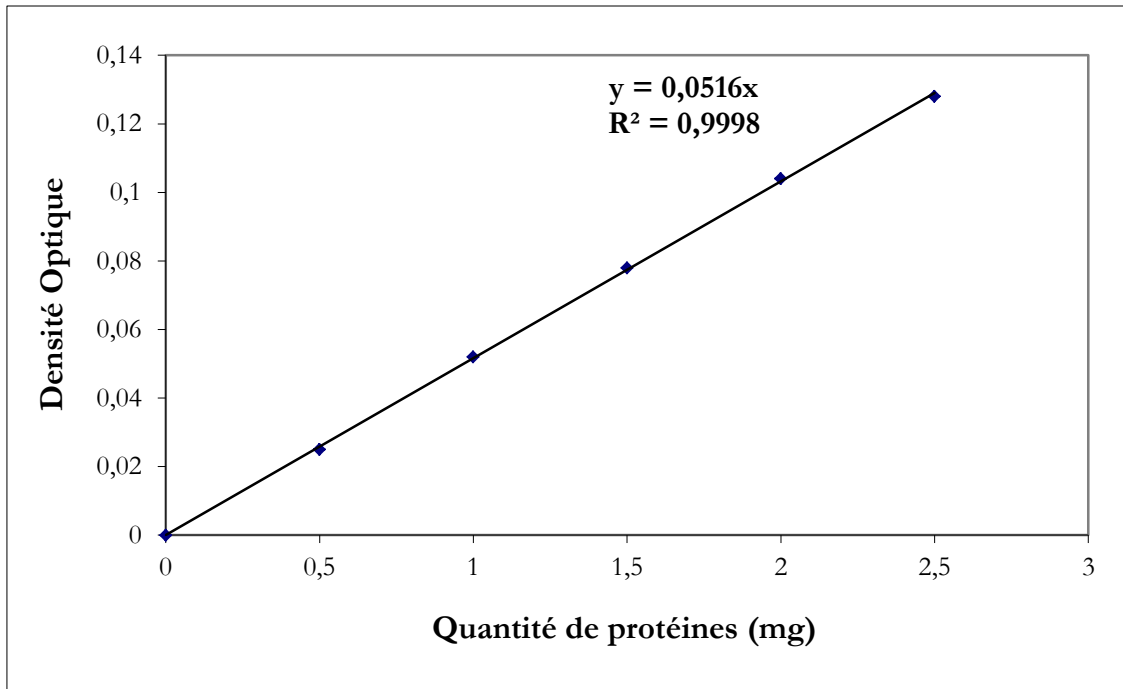


Figure c: Courbe d'étalonnage des protéines à 550 nm
Dosage par le réactif de biuret (GORNALL *et al.*, 1949)
Étalon : SAB (5 mg/ml)