

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

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

UNITE DE RECHERCHE EN
SCIENCES DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE NUTRITION ET DE BIOCHIMIE NUTRITIONNELLE
LABORATORY OF NUTRITION AND NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY

**Effets de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza*
sur quelques marqueurs du système inflammatoire chez un
modèle animal nutritionnel de la stéatose hépatique non-
alcoolique (NAFLD)**

Mémoire rédigé comme requis partiel en vue de l'obtention du Diplôme de Master

En Biochimie

Option : Sciences des Aliments et Nutrition

Par:

WANMEGNE DJOUKOUO WOMBIWO Jordan

18U2126

Licenciée-ès Science

Sous la Codirection de :

MBONG ANGIE Mary-Ann

PhD

Maitre de Conférences

Université de Yaoundé I

OBEN Julius ENYONG

PhD

Professeur

Université de Yaoundé I

Année: 2024

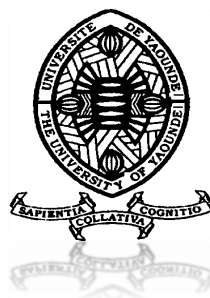


UNIVERSITE DE YAOUNDE I

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

UNITE DE RECHERCHE EN
SCIENCES DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND
TRAINING SCHOOL FOR LIFE
SCIENCE, HEALTH AND
ENVIRONMENT

DOCTORATE TRAINING OF LIFE
SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE NUTRITION ET DE BIOCHIMIE NUTRITIONNELLE
LABORATORY OF NUTRITION AND NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY

**Effets de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur
quelques marqueurs du système inflammatoire chez un modèle
animal nutritionnel de la stéatose hépatique non-alcoolique
(NAFLD)**

Mémoire rédigé comme requis partiel en vue de l'obtention du Diplôme de Master

En Biochimie

Option : Sciences des Aliments et Nutrition

Par:

WANMEGNE DJOUKOUO WOMBIWO Jordan

18U2126

Licenciée-ès Science

Sous la Codirection de :

MBONG ANGIE Mary-Ann

PhD

Maitre de Conférences
Université de Yaoundé I

OBEN Julius ENYONG

PhD

Professeur
Université de Yaoundé I

Année : 2024

DEDICACE

A

*Mes parents bien aimés : GUEDEM KENGNE Mireille et Mon feu
Papa, WANMEGNE Philippe*

REMERCIEMENTS

La réalisation de cette étude, a été possible grâce au concours de plusieurs personnes que je tiens à remercier chaleureusement. Je voudrais exprimer ma sincère gratitude à :

- ❖ **Pr OBEN Julius ENYONG**, responsable du Laboratoire de Nutrition et de Biochimie Nutritionnelle (LNNB), pour m'avoir accordé l'accès au laboratoire, pour m'avoir encadré et pour ses remarques constructives.
- ❖ **Pr MBONG ANGIE Mary-Ann** qui m'a encadré avec expertise dans la réalisation de ce travail de recherche scientifique, je suis reconnaissante pour l'attention précieuse qu'elle m'a accordée.
- ❖ **Pr MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef de Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I et à travers lui, tous les Enseignants dudit Département pour leurs enseignements.
- ❖ **Pr NTENTIE Françoise Raïssa** qui a participé à la réalisation de ce travail à travers ses encouragements constants et ses remarques constructives.
- ❖ **Pr FEKAM BOYOM Fabrice** et tous les autres membres du Laboratoire de phytobiochimie et d'étude des plantes médicinales, pour avoir permis d'effectuer au sein du laboratoire le dosage des cytokines inflammatoires.
- ❖ **Dr YOUVOP Janvier**, pour les conseils durant les séminaires
- ❖ Mes aînés (**TIENOUE Huiny, MAKAMWE Inelle, DUPON Bruno, EDOU Ferdinand**) pour la disponibilité et la collaboration dans l'élaboration de ce travail.
- ❖ Les aînés du laboratoire de sciences des aliments et métabolisme; pour l'accès à l'utilisation des appareils
- ❖ Mes camarades de laboratoire (**DONGMO Nadine, FOURA Woundi, OSSELE Anne, SOKOUDJOU Sharone**) et mes camarades de promotion, pour le soutien, les observations et les moments partagés.
- ❖ Ma Grand-mère (**MEGAPTCHE Thérèse**), mes oncles et mes tantes, mon grand-Frère (**SIMO Bertrand**), mes petites sœurs (**WANMEGNE Grace, WANMEGNE Carolina**) et mes amis ; pour le soutien moral et financier.

Tous ceux et celles nommés ou non, qui ont contribué à la réussite de ce travail par l'aide et les encouragements.

TABLE DE MATIERES

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DE MATIERES.....	iii
LISTE DES ABREVIATIONS	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ANNEXES	ix
RESUME.....	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCTION.....	1
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE	6
I.1 Généralités sur la NAFLD (stéatose hépatique non alcoolique).....	4
I.1.1 Définition	4
I.1.2 Prévalence	5
I.1.3 Facteurs de risques	5
I.1.4 Physiopathologie de la NAFLD (stéatose hépatique non alcoolique)	8
I.1.5 Modèles d'induction de la NAFLD	12
I.1.6 Prise en charge de la NAFLD	14
I.2 Généralités sur Acmella caulirhiza	17
I.2.1 Origine et classification	17
I.2.2 Description morphologique	18
I.2.3 Composition phytochimique et utilisation traditionnel.....	18
I.2.4 Toxicité	19
I.2.5 Etudes antérieures et propriétés thérapeutiques	19
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	20
II.1. MATERIEL	21
II.1.1. Matériel végétal	21
II.1.2. Matériel animal.....	21
II.1.3. Matériel de référence	22
II.1.4. Matériel de laboratoire.....	22
II.2. METHODOLOGIE	22
II.2.1 Préparation de l'extrait	23

II.2.2. Protocole expérimentale	24
II.2.3. Préparation des échantillons	26
II.2.4. Analyses biochimiques	28
II.2.5. Analyses statistiques.....	41
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION	42
III.1 RESULTATS	43
III.1.1 Validation de l'induction de la NAFLD.....	43
III.1.2 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur le métabolisme glucidique et lipidique chez les rats atteints NAFLD	44
III.1.3 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur quelques marqueurs du stress oxydant chez les rats atteints de NAFLD	48
III.1.4 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur les transaminases chez les rats atteints NAFLD	51
III.1.5 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur quelques marqueurs inflammatoires et sur quelques paramètres hématologiques chez les rats atteints de NAFLD	52
III.1.6. Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur l'aspect histopathologique du foie chez les rats atteints de NAFLD.....	54
III.2 DISCUSSION	56
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	61
CONCLUSION	62
PERSPECTIVES.....	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	66
ANNEXES	74

LISTE DES ABREVIATIONS

ACC: Acétyl-CoA Carboxylase

AGL: Acides gras libre

ALAT: Alanine amino-transférase

apoB 100: Apolipoprotéine B100

apoE : Apolipoprotéine E

ASAT: Aspartate aminotransférase

CCL2: Chimiotactique Ligand 2

CT: Cholestérol Total

CXCL1: Chimiotactique motif CXC Ligand1

CYP2E1 450: Cytochrome 2E1 450

DNPH: 2,4-Dinitrophénylhydrazine

DT2: Diabète de type 2

EASD-EASO: European Association for the Study of Diabetes-Obesity

EASL: European Association for the Study of the Liver

EDTA: Ethylène Diamine Tétracétique (Ethylene diamine tetra acetic acid)

ELISA: Test immunoenzymatique (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

HDL: lipoprotéine de haute densité (High Density Lipoproteins)

HMG-CoA: Hydroxyméthylglutaryl-CoA

IKK β : Inhibiteur du facteur nucléaire Kappa β Kinase

IL-10: Interleukine 10

IL-1 β : Interleukine 1 β

IL-6: Interleukine-6

IR: Insulino-résistance

JNK: c-Jun N-terminal kinases

LB: Lymphocyte B

LDL: Lipoprotéines de Basse Densité (Low Density Lipoproteins)

LT: Lymphocyte T

MAFLD: Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease

MCV: Maladies CardioVasculaires

MPO: Myéloperoxydase

NAFLD: Maladie non alcoolique du foie gras (Non Alcoholic Fatty Liver Disease)

NED: N-(1-Naphthyl) EthyleneDiamine

NFS: Numération Formule Sanguine

N- κ B: Facteur Nucléaire- κ B

Nrf2: Facteur Nucléaire érythroïde 2

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PPAR- γ : Récepteurs γ Activés par les Proliférateurs De Peroxysomes

SREBP-1c: Sterol Regulatory Element- Binding Protein-1c

TBA: Acide Thiobarbiturique

TG: Triglycérides

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

TLR4: Toll like receptor-4

TNF- α : Facteur de nécrose tumoral α (Tumor Necrosis Factor- α)

UI: Unité International

VLDL: Lipoprotéine de Très Basse Densité (Very Low Density Lipoproteins)

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Spectre de la NAFLD	5
Figure 2: Facteurs de risques de la NAFLD	8
Figure 3: Tissu adipeux enflammé et hépatocytes	9
Figure 4: Mécanismes physiopathologiques de la NAFLD	12
Figure 5: Bienfaits des polyphénols	18
Figure 6: <i>Acmella caulirhiza</i> (photographiée par WANMEGNE Carel,	21
Figure 7: Organigramme de l'étude	23
Figure 8: Obtention du filtrat	24
Figure 9: Description du test ELISA sandwich.....	38
Figure 10: Effet de l'induction sur le Poids des rats	43
Figure 11: Effet de l'induction sur la glycémie des rats.....	44
Figure 13: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur la variation du poids corporel des rats	45
Figure 14: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur la glycémie des rats après traitement	46
Figure 15: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur l'accumulation hépatique des triglycérides chez les rats NAFLD	47
Figure 16: Effet de l'extrait aqueux sur le métabolisme lipidique.....	48
Figure 17: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur le taux de MDA... ..	49
Figure 18: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur le taux de NO plasmatique.....	50
Figure 19: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur l'activité de la catalase	51
Figure 20: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur le taux des transaminases	52
Figure 21: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur quelques marqueurs inflammatoires biochimiques	53
Figure 22: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur l'aspect histopathologique du foie	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification botanique <i>Acmella cauliriza</i>	18
Tableau 2: Composition de la diète normale et la diète riche en graisse pour 100g.....	25
Tableau 3: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Acmella caulirhiza</i> sur les paramètres hématologiques.....	54
Tableau 4: Protocole d'une batterie de déparaffinage	I
Tableau 5: Étapes de la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine	I

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Dosage des paramètres lipidiques.....	A
Annexe 2: Dosage du MDA	B
Annexe 3: Dosage du NO.....	B
Annexe 4: dosage des protéines totales	C
Annexe 5: Courbe d'étalonnage des protéines totales	C
Annexe 6: Dosage de la catalase	D
Annexe 7: Courbe d'étalonnage Catalase	D
Annexe 8: Dosage des transaminases.....	E
Annexe 9: Courbe d'étalonnage de l'activité des transaminases	F
Annexe 10: Courbes d'étalonnage pour les marqueurs inflammatoires	F
Annexe 11: Dosage des marqueurs pro et anti-inflammatoires	G
Annexe 12: Tableaux pour le mode opératoire des coupes.....	I
Annexe 13: Clairance éthique	J

RESUME

Une mauvaise alimentation conduit à l'installation des maladies métaboliques parmi lesquelles la stéatose hépatique non alcoolique (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD). La NAFLD touche près de 25% de la population mondiale et est caractérisée par une accumulation excessive de graisses atteignant 5% du poids total du foie. Son impact est à considérer car cette dernière est associée à un risque de maladies cardiovasculaires. *Acmella caulirhiza* est une plante médicinale utilisée pour ses effets thérapeutiques sur certaines pathologies. Le but de notre étude est d'évaluer les effets de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (EAF-Ac) sur un modèle nutritionnel animal de NAFLD. Afin de déterminer cet effet, l'étude *in vivo* a été réalisée avec 30 rats de souche *Wistar*, répartis en deux groupes en fonction du poids corporel par randomisation; un groupe de 5 rats témoin négatif (TN) nourris à la diète normale, un autre groupe de 25 rats nourris à la diète *high fat* pendant 08 semaines, ce groupe a été subdivisé en 05 lots de 5 rats : un lot témoin positif (TP) recevant de l'eau distillée, quatre autres lots recevant respectivement 150 mg/kg Pc d'EAF-AC, 300mg/kg Pc d'EAF-AC, 10mg/kg Pc d'atorvastatine et 200mg/kg Pc d'extrait de poudre de curcumine pendant 28 jours par gavage utilisant une sonde. Les paramètres de contrôle ont été le poids et la glycémie. À la fin du traitement, les rats ont été mis à jeun pendant 12h, anesthésiés à l'éther puis sacrifiés. Le sang et le foie prélevés pour analyses biochimiques (marqueurs du métabolisme lipidique, atteinte hépatique, stress oxydant et inflammation), numération formule sanguine et coupes histologiques. Les résultats obtenus ont révélé que la diète *high fat* a causé des troubles métaboliques chez les rats. L'administration de l'EAF-AC a diminué l'accumulation des triglycérides hépatiques, le taux de LDL-c, l'activité des transaminases et augmenté le taux de HDL-c. L'EAF-AC a eu un effet anti-oxydant en augmentant l'activité de la catalase tout en diminuant le taux de MDA. L'EAF-AC a également diminué le taux d'IL-1 β , TNF- α et n'a entraîné aucune infiltration leucocytaire. En conclusion, l'EAF-AC à travers ses activités, a la capacité de moduler favorablement quelques paramètres métaboliques inclus dans la NAFLD.

Mots clés : Rat, *Acmella caulirhiza*, Inflammation, Stress oxydant, NAFLD, Système immunitaire, diète *high fat*

ABSTRACT

Poor diet leads to the onset of metabolic diseases including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). NAFLD affects nearly 25% of the world population and is characterized by excessive fat accumulation reaching 5% of the total liver weight. Its impact should be considered because the latter is associated with a risk of cardiovascular diseases. *Acmella caulirhiza* is a medicinal plant used for its therapeutic effects on certain pathologies. The aim of our study is to evaluate the effects of the aqueous extract of *Acmella caulirhiza* leaves (EAF-Ac) on an animal nutritional model of NAFLD. In order to determine this effect, the *in vivo* study was carried out with 30 Wistar strain rats, divided into two groups based on body weight by randomization; a group of 5 negative control rats (NC) fed a normal diet, another group of 25 rats fed a high fat diet for 08 weeks, this group was subdivided into 05 batches of 5 rats: a positive control batch (PC) receiving distilled water, four other batches receiving respectively 150 mg / kg BW of EAF-AC, 300mg / kg BW of EAF-AC, 10mg / kg BW of atorvastatin and 200mg / kg BW of curcumin powder extract for 28 days by gavage using a probe. The control parameters were weight and blood sugar. At the end of the treatment, the rats were fasted for 12 hours, anesthetized with ether and then sacrificed. Blood and liver were collected for biochemical analyses (markers of lipid metabolism, liver damage, oxidative stress and inflammation), blood count and histological sections. The results obtained revealed that the high fat diet caused metabolic disorders in rats. The administration of EAF-AC decreased the accumulation of hepatic triglycerides, the level of LDL-c, the activity of transaminases and increased the level of HDL-c. EAF-AC had an antioxidant effect by increasing the activity of catalase while decreasing the level of MDA. EAF-AC also decreased the level of IL-1 β , TNF- α and did not cause any leukocyte infiltration. In conclusion, EAF-AC through its activities, has the ability to favorably modulate some metabolic parameters included in NAFLD.

Keywords: Rat, *Acmella caulirhiza*, Inflammation, Oxidative stress, NAFLD, Immune system, high fat diet

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La consommation croissante d'aliments très riches en énergie (sucre et graisses saturés) et d'aliments ultra-transformés favorisent le surpoids et l'obésité qui sont des problèmes majeurs de santé publique dans le monde. Ces derniers reflètent les irrégularités métaboliques associées au syndrome métabolique dont la manifestation au sein du foie est la stéatose hépatique non alcoolique (**Berdja et al., 2021**). Affectant près de 25 à 30% de la population mondiale et estimée à 13,6% en Afrique (**Younossi et al., 2018**), la stéatose hépatique non alcoolique (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) est un problème de santé publique dont la prévalence tend à augmenter chaque année de façon synchronisée avec celle du syndrome métabolique. Ce trouble hépatique prédispose au développement des maladies cardiovasculaires (**Meex et al., 2020 ; Yao et al., 2023**). La NAFLD est un trouble hépatique chronique et hétérogène, établit lorsque plus de 5% des hépatocytes présentent une accumulation excessive de graisses sans aucune consommation d'alcool, ni traitements stéatogènes (méthotrexate, tamoxifène, amiodarone) (**Rama et al., 2023**).

La pathogenèse de la NAFLD a pour origine une consommation excessive de régimes riche en graisses. Elle est caractérisée par la résistance à l'insuline, les troubles du métabolisme lipidique associée à un stress métabolique suivie d'une inflammation chronique ; d'où le concept de multiple hits (**Liu et al., 2022**). L'inflammation chronique de bas grade associée à la NAFLD peut conduire à des complications intra et extra-hépatiques aboutissant à la mort de l'individu (**Petrescu et al., 2022**).

La prise en charge de la NAFLD repose sur la modification du mode de vie à travers un régime alimentaire plus sain, des exercices physiques réguliers. L'intervention pharmacologique est indispensable lorsque la prise en charge hygiéno-diététique ne suffit pas à travers la prise des médicaments tels que les insulinosensibilisants, les antioxydants, les hypolipidémiants. Néanmoins, ces médicaments présentent des risques à long terme car ils peuvent entraîner certaines complications. De plus, leur inaccessibilité pour les populations des pays en voie de développement poussent celles-ci à un repli vers les médicaments traditionnels à base de plantes. Selon l'OMS, 80% de la population mondiale ont recours aux plantes médicinales pour soigner certaines affections. *Acmella caulirhiza*, de nom vernaculaire « œil de la poule » est une plante appartenant à la famille des Astéracées (**Azame et al., 2019**), que l'on retrouve dans les zones humides et comme mauvaise herbe au bord des routes. Sa richesse en polyphénols, coumarines et d'autres composés bioactifs (**Azame et al., 2019**) est responsable de son utilisation en médecine traditionnelle pour traiter les maladies bucco-

dentaires, les morsures de serpents et les infections urinaires (Noubissi *et al.*, 2021). Des études antérieures dont certaines menées par notre équipe de recherche, ont révélé les effets anti-inflammatoires des feuilles et des fleurs d'*Acmella caulirhiza* (Tienoue *et al.*, 2024), une autre étude portant sur l'effet du mélange de l'extrait aqueux d'*Acmella caulirhiza* et de l'extrait aqueux d'*Oxalis corniculata* sur la cicatrisation osseuse des rats fracturés, a montré que ces plantes possèdent des effets anti-oxydant et anti-inflammatoire (Ngueguim *et al.*, 2022). Ces études antérieures suggèrent que la plante *Acmella caulirhiza* pourrait avoir des effets bénéfiques sur la santé hépatique à travers son action sur les cellules immuno-inflammatoires. Ainsi quels sont les effets de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur les marqueurs du système inflammatoire dans le foie des rats soumis à un régime alimentaire riche en graisse modèle d'induction de la NAFLD?

➤ **HYPOTHÈSE**

L'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* atténue l'inflammation métabolique associé à un modèle animal nutritionnel de NAFLD

➤ **OBJECTIF GENERAL**

Explorer les effets sur quelques marqueurs du système immuno-inflammatoire de l'extrait des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur un modèle nutritionnel de stéatose hépatique non alcoolique induit chez les rats de souche *Wistar*

➤ **OBJECTIFS SPECIFIQUES**

Déterminer l'effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur quelques marqueurs du métabolisme lipidique (CT, TG, LDL, HDL) et glucidique chez les rats atteints de NAFLD

Explorer l'effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur quelques marqueurs du stress oxydant (catalase et MDA) et de l'atteinte hépatique (ALAT et ASAT) chez les rats atteints de NAFLD

Évaluer l'effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur quelques paramètres du système immuno-inflammatoire (IL-1 β , TNF- α , IL-10, NFS) chez les rats atteints de NAFLD.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1 Généralités sur la NAFLD (stéatose hépatique non alcoolique)

I.1.1 Définition

Sous l'appellation récente de stéatose hépatique métabolique associée « MAFLD » dans le but de refléter sa pathogénèse, la NAFLD est l'une des maladies hépatiques la plus courante caractérisée par une accumulation excessive de graisse (>5%) dans le foie qui proviennent de 60% des acides gras liés à l'albumine, 15% de l'alimentation, 25% de la lipogenèse de *novo*. De plus, sur le plan biologique, la NAFLD est caractérisée par une hypertriglycémie, une élévation du cholestérol total, du LDL-cholestérol et une élévation des enzymes hépatiques (**Bekolo et al., 2024**). La NAFLD couvre un large spectre allant d'une simple stéatose hépatique à une stéatohépatite non alcoolique (NASH) suivie d'une fibrose, d'une cirrhose et aboutissant au cancer hépatocellulaire (**Luci et al., 2020, Petrescu et al., 2022**). Cette progression est une conséquence des dommages résultant de la peroxydation lipidique et la production des espèces réactives de l'oxygène (**Bradbury, 2006**). De nombreuses études ont révélé que la NAFLD augmente le risque de développer une maladie cardiovasculaire (**Kuzminova et al., 2016 ; Targher et al., 2020**), en effet la NAFLD est la représentation hépatique du syndrome métabolique capable de causer d'autres maladies notamment les maladies métaboliques, les carcinomes extra hépatiques, la maladie rénale chronique (**Yao et al., 2023**).

➤ **Foie gras non alcoolique (Non Alcoholic Fatty Liver, NAFL)**

Forme la plus bénigne du trouble présentant aucun signe d'inflammation. Elle s'établit biochimiquement lorsque la masse de triglycérides hépatiques correspond à plus de 5% de la masse totale du foie et histologiquement lorsque les gouttelettes lipidiques sont visibles dans plus de 5% des hépatocytes (**Rial, 2020**) en général, les hépatocytes ne contiennent que d'infimes traces de gras (**Haddab, 2009**).

➤ **Stéato-hépatite non alcoolique (Non Alcoholic Steatosis Hepatitis, NASH)**

Forme évolutive de la NAFLD, est la deuxième cause de transplantation hépatique (**Luci et al., 2020**), la NASH se manifeste par une stéatose simple avec une inflammation intralobulaire impliquant une infiltration de cellules immuno-inflammatoires (les macrophages, lymphocytes, cellules polynucléaires), un ballonnement hépatocellulaire et elle est également accompagnée par une fibrose. Le ballonnement hépatocellulaire correspond à une forme de lésions des cellules hépatiques identifiées comme des hépatocytes gonflés avec un cytoplasme diminué (**Takahashi et al., 2012; Anty et al., 2019**).

➤ **Caractéristiques histologiques de la NAFLD**

La NAFLD est classée en stéatose macrovasculaire et en stéatose microvasculaire ; la stéatose macrovasculaire est caractérisée par des vacuoles de tailles supérieures à celle du noyau occupant la quasi-totalité du cytoplasme et déplaçant le noyau vers la périphérie cellulaire. La stéatose microvasculaire correspond à de multiples petites vacuoles lipidiques et un noyau situé au centre de la cellule (Takahashi *et al.*, 2012).

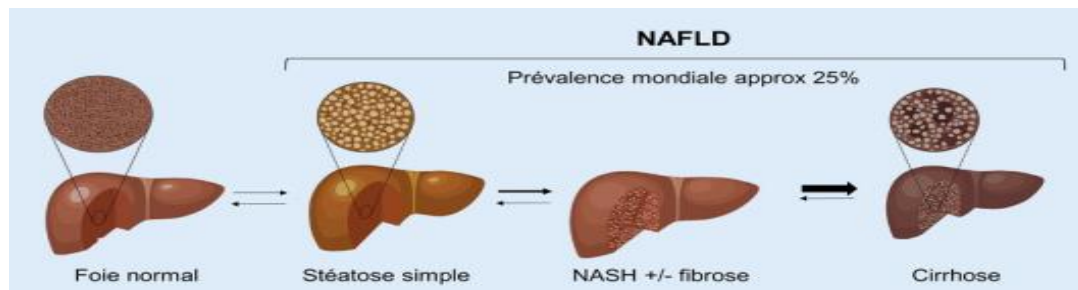


Figure 1: Spectre de la NAFLD (Zampaglione *et al.*, 2020)

I.1.2 Prévalence

La NAFLD est une maladie du foie métabolique répandue dans le monde, le nombre de personnes atteint est en augmentation constante. On estime actuellement qu'environ un quart de la population soit 25% souffre d'une accumulation de graisses anormales dans le tissu hépatique (Zandani *et al.*, 2022). L'incidence de la NAFLD varie en fonction de l'âge, sa prévalence s'élève à 25,2% chez l'adulte et 7,6% chez l'enfant (Bekolo *et al.*, 2024). L'incidence de la NAFLD varie également en fonction des régions, sa prévalence est élevée aux Etats-unis, en Asie et au moyen-orient. En Afrique, la prévalence de la NAFLD s'élève à 13,6% (Younossi *et al.*, 2018) et Bekolo *et al.*, (2023) a estimé à 48,9% la prévalence de la NAFLD chez les patients atteints de syndrome métabolique au Cameroun. La NAFLD est une maladie complexe et variable selon les individus ; son incidence et sa prévalence tend à augmenter en raison de l'augmentation croissante des facteurs qui lui sont liés notamment l'obésité et le diabète de type 2 (Yao *et al.*, 2023).

I.1.3 Facteurs de risques

De nombreux facteurs influencent le développement et la progression de la NAFLD notamment au niveau environnementale, métabolique et génétique (Luci *et al.*, 2020).

A- Facteurs de risques environnementaux

➤ Régime Alimentaire

Plusieurs études ont avancé que la composition alimentaire pourrait être un facteur de prédisposition à la NAFLD (Juanola *et al.*, 2021). En effet, un apport calorique excessif caractérisé par un régime alimentaire riche en graisses saturées, glucides et boissons sucrées est

impliqué dans le développement de la NAFLD à travers l'augmentation de la teneur en graisses intrahépatiques **(Pafili et Roden, 2021)**. En effet les glucides et les boissons sucrées sont des sources majeures qui contribuent à 30% à la production hépatique en acides gras libres, car ces derniers sont des substrats de la Lipogenèse de Novo **(Ullah et al., 2019)**.

➤ **Sédentarité**

La sédentarité est marquée par une inactivité physique. Lorsque cette dernière est associée à un régime riche en gras et en calories contribue au stockage excessif d'acides gras saturés favorisant ainsi l'obésité et par conséquent une stéatose hépatique non alcoolique, en effet la sédentarité déclenche un déséquilibre entre la consommation énergétique et la dépense énergétique **(Haddab Y, 2009)**.

➤ **Origine ethnique**

L'origine ethnique influence sur le développement de la NAFLD en effet une étude a montré que les individus hispaniques sont plus sensibles à la NAFLD que les patients blancs tandis que la susceptibilité à la NAFLD est la plus faible chez les individus noirs. Une revue systématique a suggéré que la faible susceptibilité à la NAFLD chez les afro-américains est dû à leur faible taux de triglycérides par rapport aux individus hispaniques et blancs atteints de NAFLD **(Younossi et al., 2017)**.

B- Facteurs de risques métaboliques

➤ **Syndrome métabolique**

Trouble regroupant une augmentation du tour de taille, une hyperglycémie, une dyslipidémie et une hypertension systémique. Les caractéristiques du syndrome métabolique sont associées bidirectionnellement aux caractéristiques de la NAFLD, en effet le syndrome métabolique augmente le risque de développer une NAFLD alors que le traitement de la NAFLD pourrait améliorer certaines caractéristiques du syndrome métabolique **(Juanola et al., 2021)**.

➤ **Obésité**

L'obésité est une maladie métabolique caractérisée par une accumulation excessive de masse grasse. Cette atteinte contribue au développement de la NAFLD à travers la résistance à l'insuline qui favorise l'hyper-insulinémie responsable de l'inhibition de la β -oxydation mitochondriale et de la formation des protéines transporteuses d'acides gras (apolipoprotéine B 100 et apolipoprotéine E) ce qui cause l'accumulation des acides gras libres (AGL) et des triglycérides dans les hépatocytes **(Haddab, 2009)**, conduisant à la dysfonction mitochondriale,

le stress oxydatif et l'inflammation intra-hépatique. L'obésité entraîne également la sécrétion d'adipokines et d'hormones dans le foie, ce qui contribue au développement de la NAFLD jusqu'au carcinome hépatocellulaire (**Juanola et al., 2021**)

➤ **Insulino-résistance (IR) et diabète type 2 (DT2)**

L'insuline est une hormone hypoglycémiante produite par les cellules β pancréatiques agissant dans le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. Dans un état d'insulino-résistance, les fonctions de l'insuline sur ces organes cibles sont altérées. L'insulino-résistance se manifeste d'une part, par une augmentation de l'activité lipolytique des tissus adipeux et une libération accrue des acides gras libres qui affluent dans le foie et d'autre part, au niveau hépatique, par une stimulation de la lipogenèse de Novo accentuant ainsi la stéatose (**Juanola et al., 2021**).

➤ **Microbiote intestinal**

L'intestin est un site majeur de fermentation bactérienne intestinale des aliments tels que les glucides, les acides gras conduisant à la formation des acides gras à courte chaîne dont les profils sont modifiés par la dysbiose. Des études récentes ont démontré que le microbiote intestinale affecte les métabolismes hépatiques des glucides et des lipides (**Juanola et al., 2021**, **Huang et al., 2019**) en effet L'altération de la composition du microbiote intestinal est associée à la perméabilité et à la perturbation intestinales accrues des jonctions serrées entre cellules permettant la translocation de lipopolysaccharide bactérien (LPS) (**Pafili et al., 2021**). Les lipopolysaccharides sont des modèles moléculaires associés aux agents pathogènes libérés dans la circulation portale, ils participent à l'activation des macrophages hépatiques à travers l'activation des récepteurs membranaires spécifiques, les TLR4. Ces macrophages hépatiques entraînent la libération des cytokines pro-inflammatoires ce qui conduit à une réaction inflammatoire intra-hépatique favorisant le développement de la NAFLD (**Anty et al., 2019**).

C- Facteurs de risques génétiques

Les différences dans le bagage génétique révèlent une variabilité de la susceptibilité à la NAFLD. Différentes variantes génétiques sont impliquées dans le métabolisme cellulaire des lipides hépatiques favorisant ainsi une prédisposition génétique à la NAFLD, notamment la protéine 3 contenant le domaine de la phospholipase de type patatine (PNPLA3), le membre 2 de la superfamille transmembranaire six (TM6SF2), la protéine régulatrice de la glucokinase (GCKR). Le polymorphisme génétique PNPLA3 est l'une des variations génétiques la plus courante car il produit une enzyme lipase (estérase de lipides) qui empêche la dégradation des

triglycérides et réduit leur sécrétion hépatique sous forme de lipoprotéines de très faible densité (Peng *et al.*,2020).

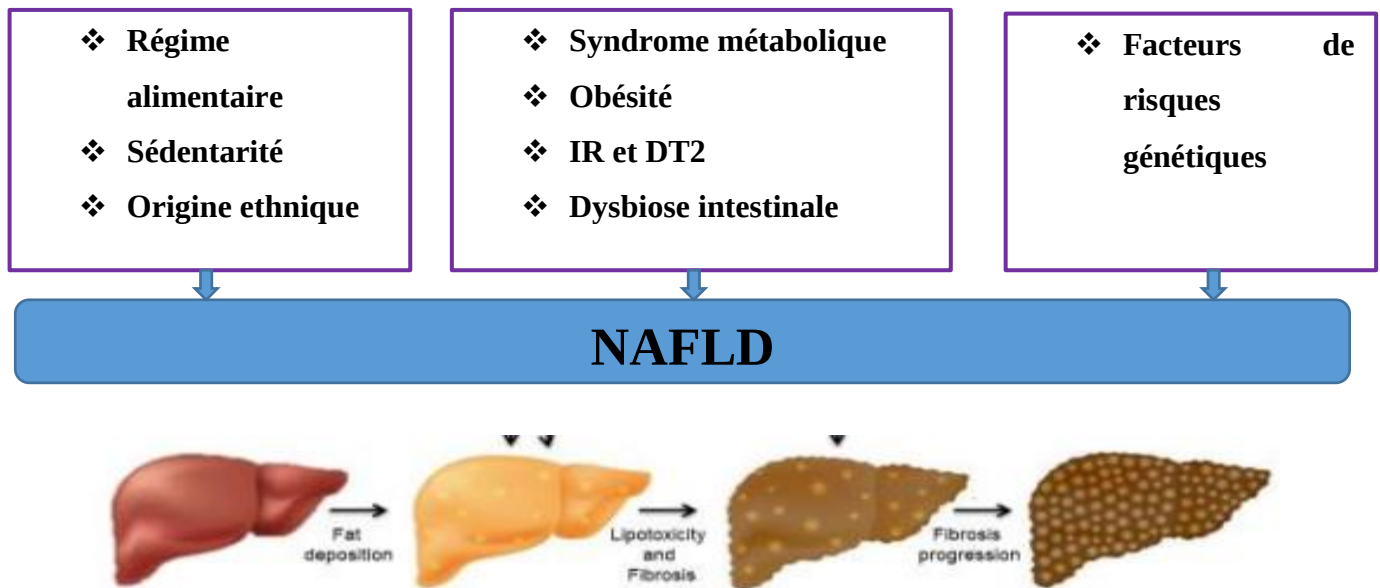


Figure 2: Facteurs de risques de la NAFLD (Huang *et al.*, 2020)

I.1.4 Physiopathologie de la NAFLD (stéatose hépatique non alcoolique)

La NAFLD est un trouble hépatique à coups multiples ; qui débute par une accumulation des graisses au niveau hépatique (stéatose) sensibilisant le foie à une seconde agression métabolique qui déclenche une cascade de lésions tissulaires (inflammation) aboutissant à une fibrose. Ce trouble présente une forte dimension immuno-inflammatoire.

➤ Accumulation des graisses

Le Foie est un organe qui reçoit son apport sanguin grâce à l'intestin via la veine porte, cet apport sanguin est riche en toxines, antigènes alimentaires, produit bactériens issus de l'environnement ce qui confère au foie, les fonctions d'organe détoxifiant et métabolique (Luci *et al.*, 2020), mais également un rôle immunologique. Au cours de l'obésité, le foie devient immunotolérant suivie d'un changement dans la production de cytokines, en faveur des cytokines pro-inflammatoire telles qu'IL-1 β , IL-6, TNF- α . La plupart des dommages causés au tissu hépatique sont dus à l'axe entre le tissu adipeux et le foie. Une suralimentation hypercalorique entraîne un afflux élevé de lipides sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux blanc viscéral caractérisé par une saturation de la capacité de réserve des adipocytes ce qui favorise leur hypertrophie et une augmentation de leur activité lipolytique. L'afflux d'acides gras saturés et de leur métabolites stimulent d'une part les macrophages résidents qui changent de polarité, passent de macrophages M2 à macrophages M1 responsables de la sécrétion des cytokines pro inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6...) au sein du tissu adipeux et d'autre part les

acides gras saturés et leurs métabolites se fixant à leurs récepteurs spécifiques Toll Like Receptor 2/4, déclenchent des voies de signalisation aboutissant à l'activation des kinases tels que JNK et IKK β qui interfèrent avec la voie de signalisation de l'insuline en inactivant la phosphorylation du récepteur à l'insuline (IRS) ce qui entraîne une résistance à l'insuline. Ces interactions accentuent l'inflammation local du tissu adipeux et altère ses fonctions à travers la lipolyse des triglycérides avec leur libération ectopiques dans les organes tels que le foie, le muscle, le pancréas... (**Rives et al., 2020** , **Youcef, 2015**), le processus d'inflammation augmente avec la croissance du volume du tissu adipeux. Dans ces conditions, on assiste à l'accumulation d'un pool d'acides gras non estérifiés et un dépôt de triglycérides dans les hépatocytes, progressivement, les hépatocytes diminuent la capacité de l'insuline à inhiber la gluconéogenèse hépatique et la synthèse des TG ce qui contribue au développement d'une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et d'une dyslipidémie (**Kuzminova et al., 2016**) de plus l'accumulation des graisses hépatiques est majorée par la lipogenèse de *Novo* qui convertit l'excès de glucide notamment le fructose en acides gras (**Rives et al., 2020**) aboutissant ainsi à une stéatose hépatique non alcoolique simple (NAFL). Lorsque la capacité des cellules hépatiques à gérer le pool de graisses hépatiques est épuisé, le stress métabolique est induit suivie de l'enclenchement des voies inflammatoires et apoptotiques, de plus la dysbiose intestinale accentue ces voies à travers la production et la libération des lipopolysaccharides (LPS) qui dans le foie, accentue l'activation des cellules de Kuppfer (macrophages) stimulant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires (**Rial, 2020**) ; le foie tombe dans un état de stress à travers le stress du réticulum endoplasmique dans les hépatocytes, le dysfonctionnement des mitochondries, ceux qui causent les dommages aux cellules hépatiques (**Kucera et al., 2011**) conduisant ainsi à une stéatohépatite non alcoolique (NASH) pouvant aboutir à une Fibrose hépatique.

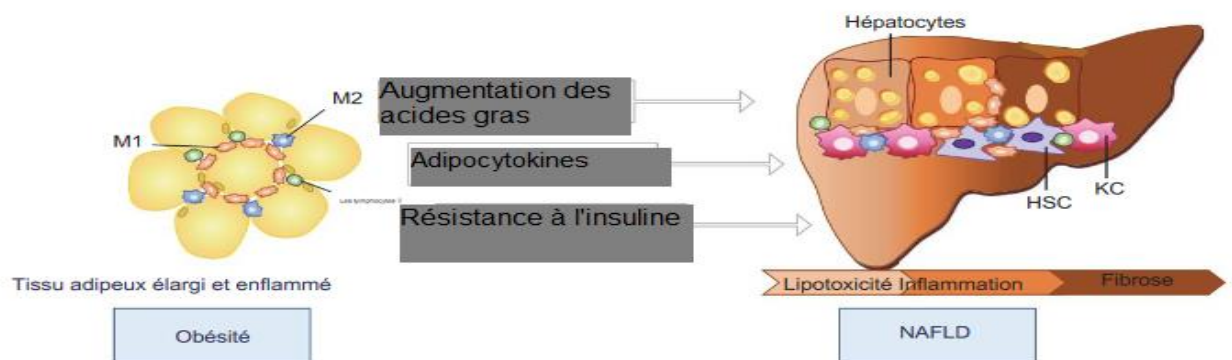


Figure 3: Tissu adipeux enflammé et hépatocytes (Alisi et al., 2017)

❖ Place du Stress oxydant dans la physiopathologie de la NAFLD

L'une des caractéristiques des maladies hépatiques chroniques est le Stress oxydant, due à une accumulation d'espèces réactives d'oxygène (« Reactive Oxygen Species » ou ROS) dans une cellule (**Song et al., 2023**). Ces espèces réactives ou espèces pro-oxydants (ROS) sont notamment la super oxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sont contrôlés par certains enzymes ; superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et la catalase mais aussi par des antioxydants apportés par l'alimentation (**Roxane, 2020**). Les ROS sont également produites par les cellules de Kupffer activées par l'ATP, par les cellules étoilées hépatiques qui sont activées par certains produits de la peroxydation lipidique et par la mitochondrie dans les différents complexes de la chaîne respiratoire. En effet le stress oxydatif se produit lorsque les ROS dépassent la capacité de piégeage des mécanismes antioxydants (**Pafili et al., 2021**).

Le flux croissant des triglycérides, des acides gras libres dans les hépatocytes entraîne la synthèse des intermédiaires lipotoxiques tels que les céramides, les diacylglycérols, des lysophosphatidylcholine, des acides gras oxydés, des métabolites de cholestérol qui agissent comme des espèces réactives d'oxygènes (ROS) (**Song et al., 2023**). La surcharge de ces AGL et de leurs intermédiaires lipotoxiques dans les hépatocytes vont causer l'augmentation de leur β -oxydation par les mitochondries, en effet cette surcharge en oxydation entraîne une dysfonction mitochondriale traduite par une perturbation dans la chaîne respiratoire conduisant ainsi à une production anormale élevée de ROS qui vont inhiber la β -oxydation. La dysfonction mitochondriale va contribuer à l'activation des voies alternatives à l'oxydation mitochondriale de ces AGL (β -oxydation peroxysomale et ω -oxydation microsomale) ce qui mène à un surplus de production des ROS et des corps cétoniques. Le pool de corps cétoniques dans les hépatocytes induit l'expression accrue de l'enzyme CYP2E1 450 qui induit l'amplification des ROS intracellulaires par conséquent le dysfonctionnement de la chaîne de transport d'électron mitochondriale (**Petrescu et al., 2022**).

Ayant une durée de vie courte, les espèces réactives de l'oxygène engendrées ont des effets locaux dans les hépatocytes. Ils s'attaquent aux lipides accumulés en particulier aux acides gras polyinsaturés et induisent la peroxydation lipidique. Au cours de la peroxydation lipidique, les aldéhydes très réactifs sont formés notamment le trans-4-hydroxy-2-nonéal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA) qui agissent comme des seconds messagers toxiques en accentuant les dommages initiés par les ROS. De plus, la peroxydation lipidique de la cellule cause un ballonnement des hépatocytes et la nécrose (**Guo et al., 2022**). Le pool accru des ROS

dans les hépatocytes active les systèmes de défense anti-oxydantes tels que la SOD, la catalase, le glutathion réduit. Une saturation ou une dysfonction dans le système de défense antioxydante hépatique peut entraîner des lésions de stéatohépatite par conséquent contribuer à la progression de la NAFLD; de plus les ROS déclenchent une réaction immuno-inflammatoire par recrutement chimiotactique d'une variété de cellules immunitaire telles que les neutrophiles, les monocytes qui stimulent la production des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de croissance transformant beta (« transforming growth factor β » ou TGF- β), l'interleukine-8 et le TNF- α (Lewis *et al.*, 2018 ; Luci *et al.*, 2020).

❖ Place de l'inflammation dans le développement de la NAFLD

L'immunité est mécaniquement impliquée dans les altérations histologiques intrahépatiques et les comorbidités extra hépatiques de la NAFLD en effet l'excès accru d'acides gras libres, les métabolites intestinaux, le stress métabolique entraînent des dommages hépatiques à travers l'activation du système immunitaire du foie (Ortiz-Lopez *et al.*, 2022) qui se manifeste par une réponse inflammatoire chronique à l'origine de la progression de la NAFLD. Cette réponse inflammatoire nécessite une coordination entre les cellules immunitaires recrutés (les macrophages résidents ou cellules de kupffer, les neutrophiles, les mastocytes, les monocytes, les cellules étoilées hépatiques, les lymphocytes), les cytokines et autres cellules de signalisation (Lewis *et al.*, 2018 ; Luci *et al.*, 2020). Les cellules de kupffer, dans les conditions physiologiques, exercent des réponses tolérogènes aux substances dérivées de l'intestin, aux antigènes commensaux et aux produits des cellules mortes. Dans un foie stéatosé, les cellules de kupffer passent à un phénotype inflammatoire libérant des médiateurs pro-inflammatoires (tels que le TNF- α , IL-1 β , l'oxyde nitrite) contribuant ainsi à l'inflammation du foie en perpétuant l'effet du régime riche en graisse à travers l'augmentation des triglycérides dans les hépatocytes, la diminution de l'oxydation des acides gras et la sensibilité à l'insuline, de plus l'activation des cellules de kupffer ainsi que l'hyper production des facteurs pro-inflammatoires entraînent le recrutement et l'accumulation des cellules inflammatoires non résidentes dans le foie (telles que les LB,LT,les neutrophiles, les monocytes). Les espèces lipidiques lipotoxiques présents dans les hépatocytes libèrent des chimiokines (CXCL1) qui recrutent les neutrophiles. L'infiltration accrue des neutrophiles dans le foie renforce l'inflammation et le recrutement des macrophages. Chez des souris nourries avec HFD, les neutrophiles libèrent une enzyme pro-oxydante MPO qui améliore la cytotoxicité des macrophages, favorise l'inflammation et la fibrose de plus les neutrophiles libèrent également l'élastase qui favorise la résistance à l'insuline. L'hyperactivité des neutrophiles contribuent aux dommages inflammatoires et à la progression de la NAFLD. Les mastocytes favorisent

également la progression de la NAFLD vers la NASH et la fibrose, en effet les mastocytes sont des cellules immunitaires intervenant dans les réactions allergiques et anaphylactiques qui par leur capacité à libérer plusieurs cytokines telles que TNF- α , TGF- β et les interleukines peuvent entraîner une stéatose microvésiculaire, une inflammation et une fibrose hépatique au cours de la NAFLD (Ortiz-Lopez *et al.*, 2022, kountouras *et al.*, 2023). De plus les lipopolysaccharides issus de la dysbiose intestinale accentuent l'inflammation, par leur présence ils entraînent la production des chimiokines (CCL2) dans les cellules étoilées hépatiques, qui recrutent les monocytes ces derniers se différencient dans le foie en macrophages, qui produisent les facteurs de croissance transformant beta et activent les cellules étoilées hépatiques responsables de la synthèse du collagène conduisant ainsi à la fibrose hépatique (Grander *et al.*, 2023). L'inflammation associée à la NAFLD a un caractère systémique car plusieurs organes alimentent l'inflammation du foie (Peiseler *et al.*, 2022).

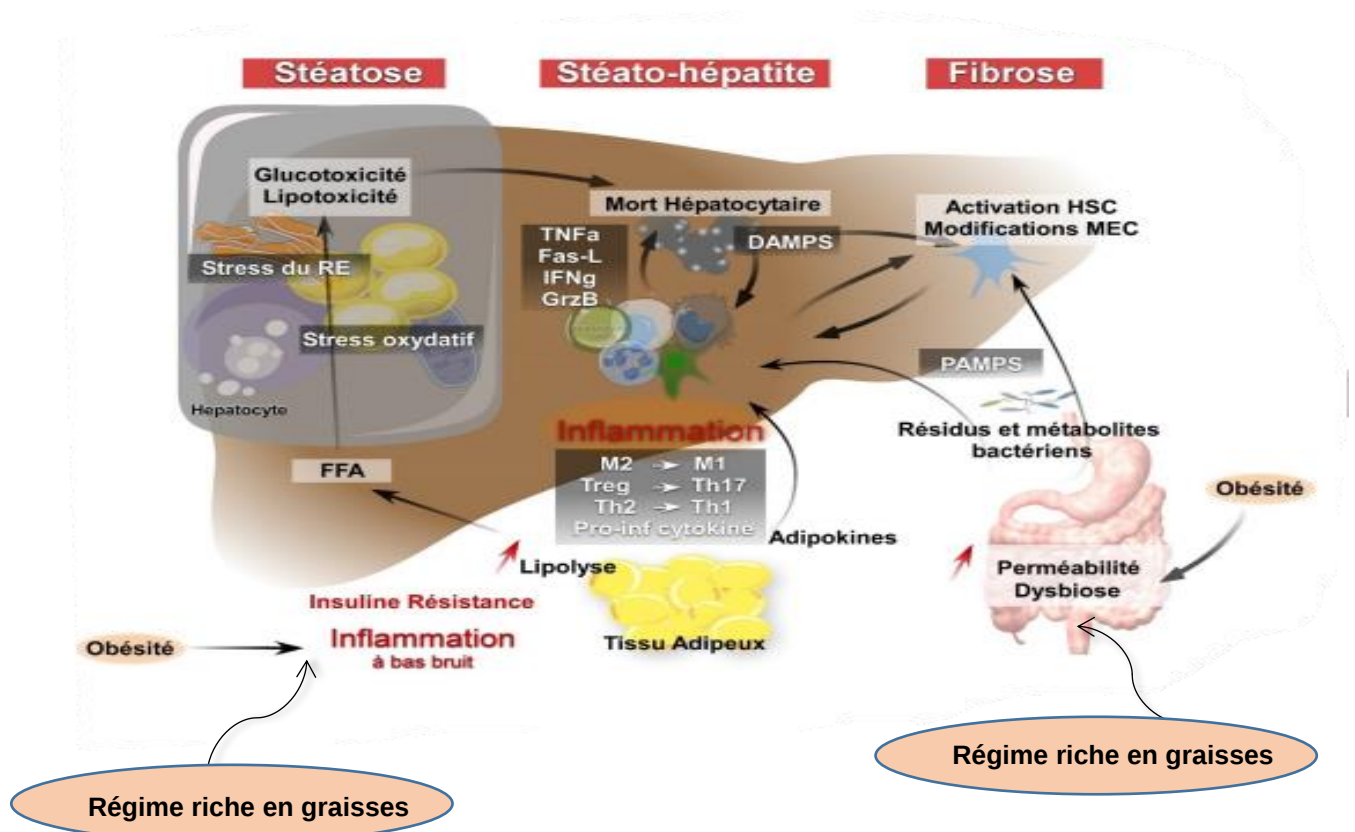


Figure 4: Mécanismes physiopathologiques de la NAFLD (leclerc, 2019)

I.1.5 Modèles d'induction de la NAFLD

Un nombre de modèles expérimentaux d'animaux existent pour l'induction de la NAFLD ; ces modèles d'induction sont répartis en modèles nutritionnels, génétiques et combinés

I.1.5.1 Modèle d'induction nutritionnelle

❖ Diète riche en graisse « Diète *High Fat* »

La diète « *High Fat* », l'un des modèles standard utilisé pour l'étude de la NAFLD, correspond au régime riche en graisse contenant une forte quantité de graisses allant de 45% à 75%. L'utilisation d'une diète *High Fat* implique une longue durée, varie selon l'espèce et la souche, de l'environnement sanitaire de l'animalerie. Une diète *high fat* peut être enrichis en Fructose « diète *high fat high fructose* » et en sucrose « diète *high fat high sucrose* ». Les complications observées par l'ingestion d'une diète *high Fat* se manifestent avec le temps. En effet l'ingestion d'une diète *high fat* entraîne une accumulation de triglycérides dans le foie après 1 à 2 semaines, l'apparition du NASH après 12 semaines (**Mahmoudi et al., 2022**). Les modèles animaux nutritionnels riches en graisses reproduisent la pathogenèse humaine de la NAFLD mais semblent ne pas présenter certaines caractéristiques de la NAFLD humaine (sa progression vers la NASH et la cirrhose) (**Kucera et al., 2011**) ;

❖ Régime déficient en choline et en méthionine

Ce régime favorise le développement rapide et progressif des complications hépatiques due à sa déficience en méthionine et en choline qui se manifeste par une fluidité membranaire modifiée et la diminution de l'export des VLDL ainsi que, La perturbation des voies de synthèse des homocystéines, du glutathion réduit et de la phosphatidylcholine respectivement chez le rat ou la souris. Cette diète favorise la synthèse du TNF- α et un stress oxydatif accru qui activent la voie de la I κ K β entraînant une insulino-résistance et une surcharge hépatique en graisses ; par conséquent des lésions hépatiques. Il contient par rapport à un régime standard 40% de sucrose et 10% de graisses. Ce régime ne représente pas la réalité humaine car on observe rarement une déficience en ces acides aminés dans l'alimentation chez l'humain, néanmoins ils sont utilisés dans les études précliniques sur la NASH car le régime déficient en choline et en méthionine induit en peu de temps les caractéristiques histologiques de la NASH (**Mahmoudi et al., 2022, Hansan et al., 2017**).

I.1.5.2 Modèle d'induction génétique

Il existe une variété de modèles génétiques de NAFLD subdivisée en modèles génétiques naturels et en modèles de mutations génétiques induites. L'un des modèles génétiques naturels est le modèle génétique des rats Zucker obèse. Ces rats ont une mutation naturelle du récepteur de la leptine qui se manifeste par la diminution de l'affinité du récepteur pour la leptine. La leptine est une hormone qui participe à la régulation du comportement alimentaire et à la dépense énergétique, à la modulation de la mort cellulaire. Les rats Zucker

obèse sont hyperleptinémiques, hyperphagiques, inactifs, obèses et insulino-résistants, ils développent une obésité sévère ainsi qu'une stéatose macrovésiculaire ou microvésiculaire sans évolution vers une stéatohépatite. Les rats Zucker obèses présentent les caractéristiques du syndrome métabolique humain mais ne reflètent pas l'étiopathogénie multifactorielle de la NAFLD. Ils nécessitent des interventions supplémentaires pour la progression vers une NASH. L'un des modèles de mutations génétiques induites est le modèle des rats transgéniques spontanément hypertendus (SHR) surexprimant SREBP-1a qui est un modèle récent. Ces rats ne sont pas obèses, ils développent une hypertension, une stéatose hépatique et des caractéristiques importantes du syndrome métabolique. De plus, lorsqu'ils reçoivent un régime riche en fructose, ils développent une augmentation significative du Stress oxydatif dans le foie. Les rats transgéniques SHR surexprimant SREBP-1a peuvent être des outils d'étude des mécanismes pathogènes associés à la NAFLD (**Kucera *et al.*, 2014**).

I.1.5.3 Modèles d'induction combinés : association d'une toxine à l'alimentation

Les modèles d'induction associant des toxines à l'alimentation riche en graisses ont été développés dans le but d'augmenter la gravité des lésions hépatiques dans les modèles de NAFLD. Ces toxines sont la streptozotocine (STZ), le tétrachlorure de carbone (CCL4). Une étude a démontré que l'administration d'une dose unique de STZ suivie de 4 à 6 semaines d'alimentation HFD chez des souris entraînait une hyperglycémie et des dommages au foie. Cependant, la STZ a une capacité à endommager d'autres organes tels que les reins via l'alkylation de l'ADN, c'est l'une des raisons qui limite son utilisation. L'association de la CCL4 à l'alimentation HFD chez des rongeurs induit une prise de poids et des caractéristiques histologiques hépatiques sévères tels que l'inflammation sévère du foie, la fibrose de stade 3 après 12 semaines d'alimentation au HFD, ce pendant la CCL4 induit ces lésions via des dommages oxydatifs à l'ADN ce qui est différent de l'évolution naturelle de la NAFLD. L'induction de la NAFLD dépend de nombreux facteurs notamment la souche de rats utilisés, le temps d'induction et le modèle d'induction (**Peng *et al.*, 2020**).

I.1.6 Prise en charge de la NAFLD

I.1.6.1 Prise en charge non Pharmacologique

Le traitement de la NAFLD implique le changement au niveau du mode de vie, de la gestion des conditions sous-jacentes notamment ;

➤ La perte de poids et exercice physique

Ils sont recommandés aux personnes obèses ou en surpoids pouvant développer une NAFLD, en général ces personnes doivent perdre 7 à 10% de leur poids corporels dans le but

de réduire la graisse du foie et améliorer la fonction hépatique de plus une perte de poids profonde élimine une partie de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans le tissu adipeux et 150 minutes/semaines d'activité physique d'intensité modérée telle que recommandé par l'EASL réduit la graisse hépatique et le risque de MCV (**Grander et al., 2023**) ;

➤ **Modifications du régime alimentaire**

Il est recommandé d'avoir une alimentation pauvre en graisses saturées, en graisses trans, en glucides raffinés mais riche en fruits, en graines entières, en protéines maigres (**Rama et al., 2023**), d'opter pour un régime strictement hypocalorique. L'association de la perte de poids à la modification du régime alimentaire contribuent à la normalisation de la sensibilité à l'insuline et au profil lipidique (**Luci et al., 2020**) ;

➤ **La chirurgie bariatrique métabolique**

Elle correspond à une autre option thérapeutique entraînant la perte de poids durable chez les patients obèses atteints de NAFLD (**Pafili et al., 2021**). La chirurgie bariatrique consiste à limiter le volume de nourriture pouvant être consommé. Une étude a démontré l'impact de la chirurgie bariatrique sur la NAFLD, en effet la chirurgie bariatrique a conduit à une résolution de 85% de la stéatose, 75% de la fibrose et 50% du ballonnement des hépatocytes chez 18 patients atteints de 67% de NASH et 5,5% de cirrhose de foie (**Mundi et al., 2019**).

Bien qu'étant importantes, les modifications du mode de vie ne suffisent pas à elles seules pour la gestion de la NAFLD en particulier dans les stades avancés de la maladie, où l'inflammation et la fibrose sont persistantes (**Peng et al., 2020**).

I.1.6.2 Prise en charge Pharmacologique

La prise en charge thérapeutique de la NAFLD correspond à agir sur les points clés de sa physiopathologie. Plusieurs traitements ont été proposés pour assurer la gestion de la NAFLD, mais aucun de ces traitements n'est définitif pour la NAFLD (**Mahmoudi et al., 2022**).

➤ **Agents antidiabétiques et insulino-sensibilisateurs**

Les agonistes du PPAR améliorent la signalisation de l'insuline et l'homéostasie du glucose à travers la modulation des flux lipidiques grâce à leur capacité à cibler les facteurs de transcriptions nucléaires qui stimulent surtout la différenciation des adipocytes et le remodelage du tissu adipeux (**Pafili et al., 2021, Targher et al., 2020**). La pioglitazone est un activateur sélectif de PPAR- γ considéré comme un puissant insulino-sensibilisateur admis pour le traitement du DT2. En effet la pioglitazone possède des effets durables à travers la réduction des concentrations plasmatiques du glucose chez les individus diabétiques, la baisse

de la tension artérielle l'un des facteurs de risque des MCV. De nombreuses études ont démontré l'effet de la pioglitazone sur le foie à travers sa capacité à diminuer le flux d'acides gras libres vers le foie et à augmenter le taux d'adiponectine. La pioglitazone est recommandé par trois lignes directrices (EASL-EASD-EASO) pour le traitement de la NASH mais cependant, la pioglitazone présente des effets secondaires notamment un risque de fracture osseuse, un risque d'insuffisance cardiaque, un risque accru de prise de poids (**Targher et al., 2020**) ;

➤ **Les agents antioxydants**

La vitamine E, antioxydant liposoluble présent en concentration élevé dans les cellules immunitaires, est un nutriment connu pour moduler la fonction immunitaire (**Lewis et al., 2018**). Elle est utilisée comme option thérapeutique par les patients non diabétiques atteints de NAFLD lorsque les modifications du mode de vie n'ont pas présenté les résultats attendus contre les caractéristiques de la NAFLD. Une étude a montré que la prise de 800UI/jour de vitamine E réduit de façon significative la stéatose hépatique et le taux d'alanine aminotransférase, cependant quelques méta-analyses soutiennent que la prise à long terme de vitamine E présente un risque accru d'accident vasculaire cérébral hémorragique (**Pouwels et al., 2022**) ;

➤ **Les agents hypolipémiants**

Les statines sont une classe d'hypolipémiants qui inhibent l'activité de l'Hydroxyméthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) réductase et donc la synthèse du cholestérol intracellulaire. L'utilisation des statines est recommandée comme une option thérapeutique chez les patients présentant des taux plasmatiques élevées de LDL-c ($> 5\text{mmol/L}$), chez des diabétiques de type 2 âgées de 40 à 75 ans et chez des patients présentant un risque de MCV dans le contexte de NAFLD. Mais peu de données portant sur les paramètres histologiques hépatiques existent pour montrer l'action des statines sur la NASH (**Duriez et al., 2003, Targher et al., 2020**).

Dans le but de promouvoir la santé et de minimiser les effets secondaires indésirables de certains produits pharmacologiques, les alternatives à la médecine moderne ont été proposé notamment la phytothérapie, pour la gestion des points clés de la NAFLD à travers les métabolites secondaires contenus dans les plantes naturelles, de plus le développement des médicaments a pour source la plus productive les plantes naturelles (**Yao et al., 2023**).

I.1.6.3 Prise en charge phytothérapeutique

Un grand nombre de molécules d'origine végétale ont été étudié dans le but de gérer les maladies liées au foie. En utilisant des composés d'origine naturelle pour la prise en charge de

la NAFLD, il serait possible de diminuer le stress oxydatif, d'éviter la réaction inflammation qui en résulte et d'exercer un effet préventif en limitant sa progression (**Van de Wier et al., 2017**)

- *Moringa oleifera* est une plante médicinale de la famille des Moringacées utilisée en cosmétiques et comme ingrédient alimentaire. La plante *Moringa oleifera* présente des effets pharmacologiques en raison des composés bioactifs présents dans ses feuilles. Ces dernières ont un effet sur l'amélioration de la NAFLD et elles sont utilisées comme supplémentation (thérapie adjuvante) contre la NAFLD. Une revue systématique a montré que l'extrait aqueux de feuille de *Moringa oleifera* pourrait apporter une amélioration significative des caractéristiques histopathologiques du foie, du glucose et du métabolisme lipidique sur un modèle animal (**Nurhayati et al., 2024**) ;
- La plante *Curcuma longa* de la famille des zingibéracées est utilisée en médecine traditionnelle pour ses effets sur l'inflammation et les maladies du foie de plus elle possède de nombreuses propriétés pharmacologiques parmi lesquels les propriétés anti tumoraux, anti-inflammatoires, antioxydants, antidiabétiques. Ces propriétés sont attribuées à la curcumine, molécule active présente dans le *Curcuma longa*. De nombreuses études in vivo et in vitro ont indiqué que la curcumine possède plusieurs effets lui permettant d'intervenir dans la pathogénèse de la NAFLD (**Nguyen et al., 2022, Murugan et al., 2021**).

Aucun traitement à base de plante n'a été cliniquement prouvé pour soulager la maladie, néanmoins l'exploitation de ces plantes médicinales demeure une approche efficace pour la gestion de la NAFLD (**Zandani et al., 2022**). C'est dans cette optique que nous avons porté notre intérêt sur la plante *Acmella caulirhiza*.

I.2 Généralités sur *Acmella caulirhiza*

I.2.1 Origine et classification

Acmella caulirhiza, également appelé *Spilanthes Acmella*, *spilanthes africana*, est une plante herbacée à fleurs annuelle ou vivace, appartenant à la famille des Astéracées (**Onyango et al., 2017**), connue localement au Cameroun sous le nom vernaculaire de « l'œil de la poule ». *Acmella caulirhiza* est présente dans les zones tropicales et subtropicales principalement dans trois continents, L'Afrique, l'Amérique et l'Asie (**Azame et al., 2019**). sa classification botanique est mentionnée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1: Classification botanique *Acmella caulirhiza*

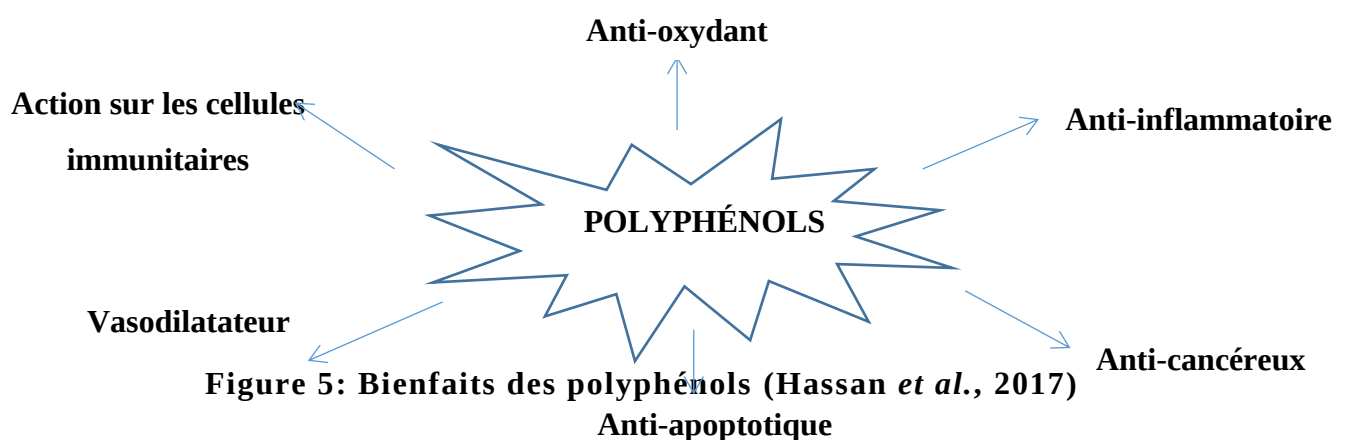
Taxonomie	Noms
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Acmella</i> Rich.ex Pers
Espèce	<i>Acmella caulirhiza</i> De

I.2.2 Description morphologique

Acmella caulirhiza est une plante rampante ou trainante ayant des parties supérieures qui s'étendent jusqu'à 30 cm, des feuilles vertes et ovales et des fleurs jaunes foncées (**Bussman et al., 2021**)

I.2.3 Composition phytochimique et utilisation traditionnel

Une étude de **Onyango et al (2017)** a démontré à partir de l'étude phytochimique de l'extrait aqueux de *Acmella caulirhiza*, que la plante *Acmella caulirhiza* contient des flavonoïdes, terpénoïdes, des coumarines et des composés stérols et une autre portant sur le screening phytochimique de l'extrait aqueux de *Acmella caulirhiza*, a révélé que *Acmella caulirhiza* contient les coumarines, les mucilages et les polyphénols (**Azame et al., 2019**), de plus *Acmella caulirhiza* contient également des composés tels que le stigmasterol, le phytol, les stérol, les phénols, les alcaloïdes (**Tienoue et al., 2024**). Son usage thérapeutique traditionnel est justifié par la présence d'une variété de métabolites secondaires.



Acmella caulirhiza est utilisée en Afrique contre diverses affections. Elle est macérée dans son entier pour combattre l'amygdalite et les maladies respiratoires, les feuilles

fraîches broyées sont utilisées contre l'érythème fessier et les caries dentaires des nourrissons. *Acmella caulirhiza* intervient également dans le traitement du cancer du sein à travers la prise par voie orale de l'infusion dans de l'eau froide des feuilles fraîches broyées. De plus, *Acmella caulirhiza* possède des propriétés analgésiques contre les maux de dents et pour apaiser les douleurs de la gencive lors des extractions dentaires (**Onyango et al., 2017 ; Tienoue et al., 2024 ; Sahu et al., 2011**).

I.2.4 Toxicité

Une étude portant sur la toxicité aiguë par voie orale de *Acmella caulirhiza* a démontré qu'à une dose de 5000mg/kg, *Acmella caulirhiza* entraîne une augmentation de L'ALAT ce qui pourrait favoriser une cytolysé hépatique mais elle n'a aucun effet sur les muscles et le cœur (**Azame et al., 2019**). L'étude de **Ngueguim et al., (2015)** a montré que l'administration de l'extrait aqueux de *Spilanthes Africana* (synonyme *Acmella caulirhiza*) à la dose unique de 2000 mg/kg ou 5000 mg/kg a induit une réduction de la mobilité, de la sensibilité au bruit et au toucher chez les rats. une autre étude portant sur la toxicité sub-aiguë de l'extrait aqueux des feuilles et fleurs d'*Acmella caulirhiza* a révélé que à la dose 500mg/kg de poids corporels l'extrait a des effets délétères tels que l'augmentation du poids relatif du cerveau, de l'utérus et des ovaires et une modification de certains paramètres hématologiques chez les rats (**Tienoue et al., 2023**).

I.2.5 Etudes antérieures et propriétés thérapeutiques

La variété de métabolites secondaires présents au sein de l'espèce *Acmella caulirhiza* , lui confère plusieurs propriétés thérapeutiques notamment les propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anti-tumorales (**Sahu et al., 2011**) qui ont été démontré dans quelques études pharmacologiques et phytochimique antérieures parmi lesquels la revue sur les effets antioxydants et anti-inflammatoires potentiels de *Acmella caulirhiza* et ses effets bénéfiques sur la santé ; qui se focalise sur les rapports expérimentaux in vitro et in vivo des actions anti oxydantes et anti inflammatoire de *Acmella caulirhiza* et leur avantage potentiels sur la santé en réduisant le risque de maladies liées au stress oxydatif (**Abdul et al., 2021**), une étude portant sur l'évaluation des propriétés anti-Tumorales de l'extrait aqueux des feuilles et fleurs de *Acmella caulirhiza* démontrant (à des doses différentes) que l'extrait aqueux d'*Acmella caulirhiza* réduit de manière significative le volume tumoral et améliore les paramètres inflammatoires (**Tienoue et al., 2024**), une autre étude portant sur l'effet du mélange de l'extrait aqueux d'*Acmella caulirhiza* et de l'extrait aqueux d'*Oxalis corniculata* sur la cicatrisation osseuse des rats fracturés, a montré que ces plantes possèdent des effets anti-oxydant et anti-inflammatoire dû aux composés bioactifs présents dans le mélange (**Ngueguim et al., 2022**)

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL

Pour la réussite de ce travail, le matériel ainsi que les méthodes utilisées sont présentés dans cette session;

II.1.1. Matériel végétal

Les feuilles d'*Acmella caulirhiza* représentant le matériel végétal, ont été récoltées au Cameroun plus précisément à Yaoundé durant la période allant du mois d'Aout 2023 au mois d'Octobre 2023 en matinée. La plante *Acmella caulirhiza* a été identifiée à l'herbier national de Yaoundé 1 sous le numéro 33076 HNC.



Figure 6: *Acmella caulirhiza* (photographiée par WANMEGNE Carel, 2023)

II.1.2. Matériel animal

L'étude a été menée avec trente (30) rats mâles de souche *Wistar* ayant un poids moyen de $208g \pm 28g$ provenant de l'animalerie de l'Institut de Recherches Médicales et d'études des Plantes Médicinales (IMPM). L'expérimentation animale s'est déroulée à l'animalerie du Laboratoire de nutrition et de biochimie nutritionnelle de l'université de Yaoundé 1. Les rats ont été acclimatés pendant 7 jours aux conditions de l'animalerie (température ambiante, alternance des jours et des nuits) avant le début de l'expérimentation dans des bassines en plastiques ayant un couvercle en acier inoxydable, contenant de la litière ; du copeau de bois blanc changé tous les deux jours. Les rats ont eu accès à de l'eau et à l'aliment quotidiennement suivant les directives du comité d'éthique de l'Université de Yaoundé 1 (N° BTC-JIRB2024-112).

II.1.3. Matériel de référence

L'atorvastatine et la curcumine ont été utilisés comme matériel de référence. La curcumine a été fourni par le Laboratoire de nutrition et de biochimie nutritionnelle et l'Atorvastatine a été achetée en pharmacie.

II.1.4. Matériel de laboratoire

➤ Réactifs

Eau distillée NaCl (0,9%)	Réactifs du kit HDL-c <i>liquicolor</i>	Réactifs du kit <i>Microelisa Stripplate</i>
Formol 10%	Solution de DNPH	Eau oxygénée
Dichlorométhane	Solution de NaOH	Tampon phosphate
Méthanol	Pyruvate de sodium	Réactif dichromate potassium 5%
Diazépam et kétamine	Réactif TBA	Acide acétique
Réactifs du kit <i>labcare</i>	Sulfanilamide	Solution de NED

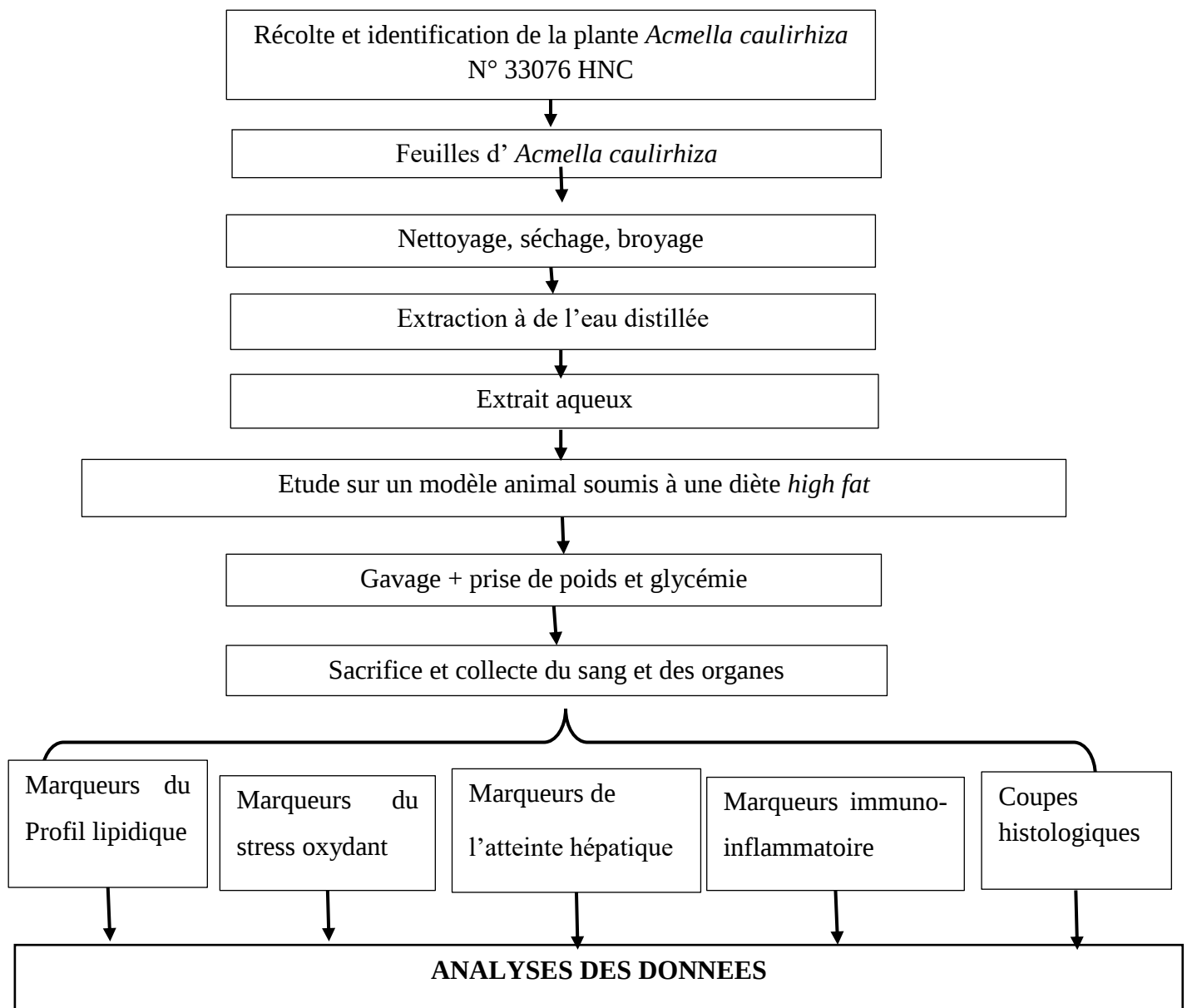
➤ Appareillages et verreries

Spectrophotomètre	Pipette pasteur
Centrifugeuse	Micropipette et ambouts
Microscope optique <i>Scientico STM-50</i>	PH mètre
Microtome <i>Reichert-Jung 2030</i>	Lames
Déshydrateur alimentaire	Sonde
Lecteur de plaque de micro titration	Fiole jaugée
Auto analyseur <i>MINDRAY BC2800</i>	Erlenmeyer
Incubateur	Tubes
Balance sensible	Station d'enrobage <i>Microm Heidelberg</i>
Bain-marie	Béchers

II.2. METHODOLOGIE

L'organigramme ci-contre (Figure7) présente les étapes de la démarche expérimentale employée dans cette étude. Après récolte, traitement des feuilles et extraction aqueuse, l'effet de l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Acmella caulirhiza* a été déterminé sur la glycémie,

la variation de poids, les marqueurs lipidiques, les marqueurs du statut oxydant, les marqueurs de l'atteinte hépatique, quelques marqueurs immuno-inflammatoire et sur l'histologie hépatique.



II.2.1 Préparation de l'extrait

Les plantes d'*Acmella caulirhiza* (Figure 8a), après récolte, ont été triées, lavées, séchées à l'ombre. Après séchage, les feuilles (Figure 8b) ont été séparées des tiges puis elles ont été broyées à l'aide d'un robot mixeur pour obtenir une poudre qui a été par la suite pesée et utilisée pour effectuer l'extraction.

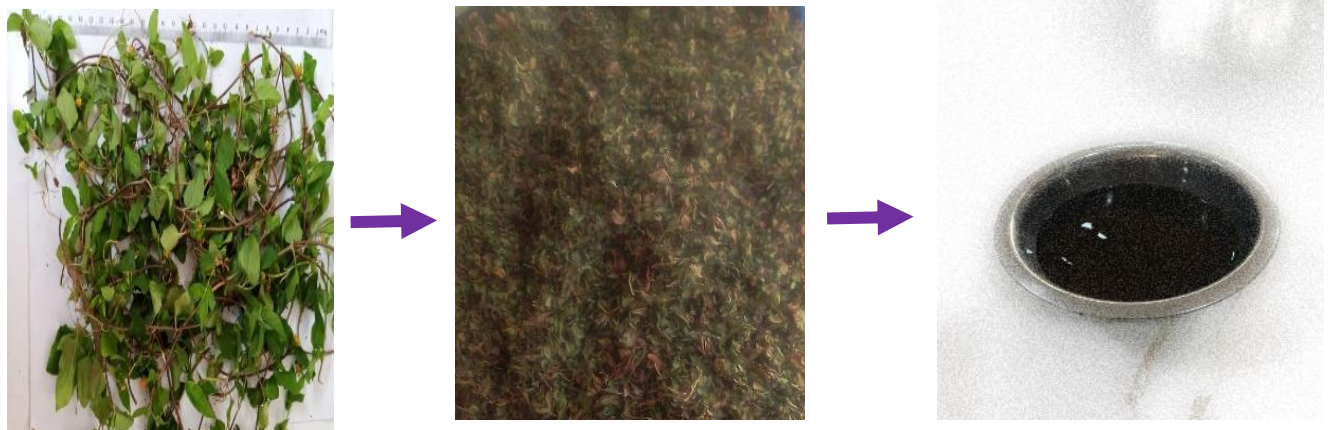
➤ Extraction

L'extraction a été réalisée selon le procédé de **Tienoue *et al.*, 2023** avec quelques modifications (le temps, la température et l'appareil de séchage du filtrat). La poudre obtenue a été macérée dans de l'eau distillée en utilisant le rapport 1:12(poids/volume) pendant 24 heures à température ambiante (25°C). Le mélange obtenu a été filtré sur papier whatman n°3 afin d'enlever les résidus solides. Le filtrat obtenu (Figure 8c) a été séché au déshydrateur alimentaire à 50°C pendant 4 jours et l'extrait brut obtenu a été conservé à -4°C.

➤ Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de l'extrait (g)}}{\text{Masse de la poudre avant extraction}} \times 100$$



a) Plantes entières fraîches

b) Feuilles séchées

c) Filtrat

Figure 8: Obtention du filtrat (photographiée par WANMEGNE Carel, 2023)

II.2.2. Protocole expérimentale

II.2.2.1. Induction de la stéatose hépatique non alcoolique

L'induction de la stéatose hépatique non alcoolique a duré huit (08) semaines et a été réalisée grâce à une diète hypercalorique « diète *high fat* » dont la composition est présentée dans le Tableau 2 :

Tableau 2: Composition de la diète normale et la diète riche en graisse pour 100g

Composants de la diète	Composition dans 100g		Composition nutritionnelle (g/100g)						Énergie en Kcal	
			Glucides		Protéines		Lipides			
	DN	DEG	DN	DEG	DN	DEG	DN	DEG	DN	DEG
Lait	10.5	9	0,462	0,396	0,357	0,306	0,3885	0,333	6,82	5,85
Farine de poisson	9.5	6.5	0	0	6,65	4,55	1,9	1,3	42,75	29,25
Huile de Palme raffinée	6	/	0	/	0	/	6	/	54	/
Graisse de Porc	/	40	/	0	/	0	/	40	/	360
Farine de maïs	32	23.5	20,57	15,11	2,97	2,18	1,40	1,03	112,96	82,95
Farine de blé	19.5	11	13,51	7,62	2,28	1,28	0,156	0,088	66,88	37,73
Sel	1	1	/	/	/	/	/	/	/	/
Farine d’Os	2	2	/	/	/	/	/	/	/	/
Poly vitamines	2	2	/	/	/	/	/	/	/	/
Cellulose	1	1	/	/	/	/	/	/	/	/
Eau	16.5	4	/	/	/	/	/	/	/	/
TOTAL	100	100	34,542	23,126	5,607	8,316	9,844	41,451	283,41	515,78

DN : Diète Normal DEG : Diète Enrichie en Graisses

Après une semaine d'acclimatation, les rats ont été répartis au hasard en 2 groupes et ces groupes ont été nourris comme suit :

- **Un groupe de cinq (05) rats** : nourri à la diète normale (DN) ;
- **Un groupe de vingt-cinq (25) rats** : nourri à la diète enrichie en graisses (DEG).

Les paramètres de contrôle ont été pendant l'induction la prise de poids et la glycémie.

II.2.2.2. Traitement des rats

Après induction, l'alimentation n'a pas été changée. Le groupe de cinq rats nourri à la diète normale et de l'eau distillée a représenté le **Témoin négatif (G1)** et le groupe de 25 rats a été réparti comme suit au cours du traitement :

- ❖ **Témoin positif (G2):** nourris à la diète *high fat* sans traitement + eau distillée
- ❖ **Groupe 3:** nourris à la diète *high fat* + 150 mg/kg de poids corporels d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* + eau

- ❖ **Groupe 4:** nourris à la diète *high fat* + 300 mg/kg de poids corporels d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* + eau
- ❖ **Groupe 5:** nourris à la diète *high fat* + l'extrait aqueux de poudre de curcumine (200mg/kg)+eau
- ❖ **Groupe 6:** nourris à la diète *high fat* + atorvastatine (10mg/kg) + eau

Les groupes témoin négatif et témoin positif ont été gavés avec de l'eau distillée tandis que les autres groupes ont été gavés à l'aide d'une sonde respectivement avec l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (150 mg/kg de poids corporels d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* pour le groupe 3 et 300 mg/kg de poids corporels d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* pour le groupe 4) et les médicaments de référence en matinée. Le traitement des rats a duré 28 jours durant lesquels les paramètres observés ont été les suivants : le poids (diminution ou augmentation), la glycémie, la prise hydrique, la survenue d'une mort (Azame *et al.*, 2019). Le volume d'administration a été de 5mL/kg de poids corporels.

II.2.2.3. Variation du poids corporel

La prise de poids a été effectuée durant toute l'expérimentation et le pourcentage de variation du poids corporels a été déterminé grâce à la formule suivante :

$$\text{Variation du poids (\%)} = ((P_t - P_{\text{initial}}) / P_{\text{initial}}) \times 100$$

Pt correspond au poids après 7jours

II.2.2.4. Glycémie

La mesure de la glycémie a eu lieu avant le sacrifice des rats et a été effectué en utilisant un glucomètre à bandelettes réactives « *One Touch Ultra* ».

II.2.2.4. Sacrifice des rats

Au terme du traitement, les rats ont été mis à jeun pendant 12h et sous anesthésie légère à l'éther avant d'être sacrifiés. Les organes (foie entier) ont été prélevés pour la préparation des homogénats et le sang a été recueillis dans les tubes EDTA, héparines et secs pour la préparation du plasma et du sérum et des hémolysats. Les foies ont été conservés dans du formol 10% pour établir les profils histologiques.

II.2.3. Préparation des échantillons

➤ Prélèvement du sang

Le sang a été prélevé dans 03 tubes ; dans les tubes EDTA pour la numération formule sanguine, dans les tubes héparinés pour la préparation du plasma et dans les tubes secs pour la préparation du sérum.

➤ **Préparation du plasma**

Les tubes héparinés contenant le sang collecté, ont été centrifugés pendant 10 min à 1500 tr/min à 25°C. Les surnageants représentant le plasma ont été aliquotés et conservés dans les tubes *Eppendorf* de 1,5 ml à -20°C pour le dosage des paramètres du profil lipidique et des transaminases.

➤ **Préparation du sérum**

Les tubes secs contenant le sang collecté ont été centrifugés pendant 10 min à 1500 tr/min à 25°C. Les surnageants (sera) obtenus ont été aliquotés et conservés dans les tubes *Eppendorf* de 1,5 ml à -20°C pour le dosage des marqueurs de l'inflammation (TNF α , IL-1 β , IL10).

➤ **Préparation des homogénats à 10%**

Les foies recueillis ont été pesé et une portion de chaque foie a été broyée dans un mortier. Le broyat obtenu a été homogénéisé avec du NaCl (0,9%) et centrifugé à 3500tr/min pendant 10 min à 25°C. Les surnageants ont été aliquotés et conservés dans les tubes *Eppendorf* à -20°C pour le dosage du MDA.

➤ **Préparation de l'hémolysât**

Le culot obtenu au fond des tubes héparinés après centrifugation du sang pour obtenir le plasma a servi à la préparation de l'hémolysât. Un volume de 100 μ L de culot a été introduit dans des tubes à essai. Le culot a été lavé dans 2mL d'une solution de NaCl (0,9%), centrifugé à 1500 tr/min pendant 10 min à température ambiante et le surnageant obtenu a été prélevé et versé. Ce processus a été répété 2 fois. L'hémolyse des érythrocytes a été réalisée en ajoutant 2mL d'eau distillée dans le culot résultant des lavages. La solution obtenue a été centrifugée à 1500 tr/min pendant 10 min à 25°C. Le surnageant obtenu a été aliquoté puis conservé dans des tubes *Eppendorf* à -20°C pour le dosage d'une enzyme antioxydante, la catalase.

➤ **Extraction des lipides hépatiques totaux**

L'extraction des lipides totaux a été réalisé à partir d'homogénats de foie suivant la méthode à froid de **Folsch et al., 1957**.

i)

ii) **Principe**

Cette méthode est utilisé pour l'extraction et la purification des lipides totaux à partir des tissus animaux, elle est basée sur l'extraction à froid par un mélange de solvants apolaire (dichlorométhane) et polaire (méthanol) dans les proportions 2 /1 (V :V) avec addition d'une solution de NaCl afin d'assurer la séparation des phases. Les composés hydrophiles (glucides et protéines) sont présents dans la phase supérieure, composée de méthanol et d'eau, dont la

dissolution est facilitée par la présence de sel, tandis que les lipides sont dissous dans la phase organique inférieure.

iii) Réactifs utilisés

- Dichlorométhane (99,5%)
- Méthanol (99%)
- NaCl (0,9%)

iv) Mode opératoire

Une masse de 0,5g de foie a été pesée et broyée dans un mortier. 9,9mL d'une solution du mélange Dichlorométhane:méthanol (2:1) a été ajouté au broyat par la suite le mélange a été introduit dans un tube qui a été placé préalablement dans de la glace, le mélange a été homogénéisé pendant 5 minutes puis filtré sur du papier whatman et le filtrat a été transvasé dans un autre tube afin d'y ajouter 2mL d'une solution de NaCl (0,9%). Le tube a été agité pendant quelques secondes puis ce dernier a été centrifugé à 2000g pendant 5 minutes. La phase organique supérieure (glucides et protéines) a été prélevé puis conservé (-20°C) et une quantité de la phase organique inférieure (extrait lipidique) a été prélevé pour évaluer la teneur en triglycérides hépatiques à l'aide du kit de quantification des triglycérides et cette teneur a été exprimée en mg/g de foie.

II.2.4. Analyses biochimiques

II.2.4.1. Exploration de l'effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur les marqueurs du métabolisme lipidique

Les paramètres du métabolisme lipidique explorés ont été : les triglycérides hépatiques et plasmatiques, le cholestérol total, le cholestérol LDL et le cholestérol HDL. Le dosage de ces paramètres du métabolisme lipidique a été effectué en utilisant les kits dont les compositions se retrouvent en **Annexe 1**.

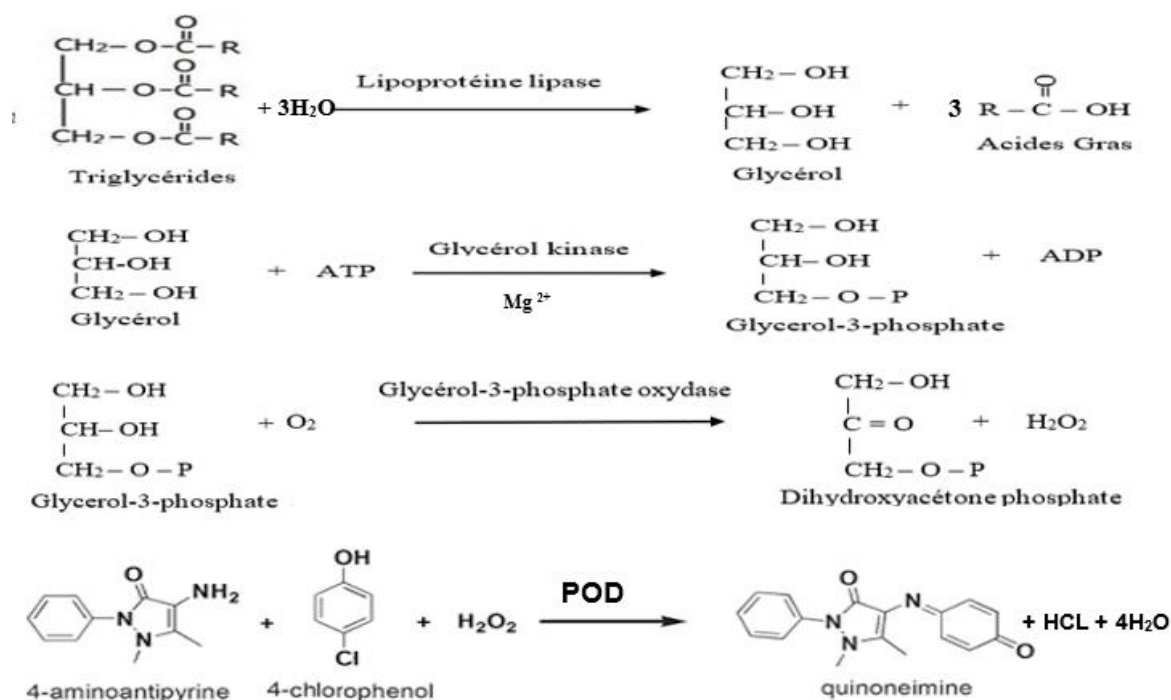
➤ Dosage des Triglycérides Plasmatiques et hépatiques

La détermination des triglycérides a été fait selon la méthode de **Fossati *et al.*, 1982**, à l'aide du Kit *Labcare* dans le plasma et l'extrait lipidique issu de l'homogénat du foie.

i) Principe

Les triglycérides sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase en glycérol et en acides gras. Ce glycérol est phosphorylé par l'ATP sous l'action du glycérol kinase (GK) pour produire du glycérol-3-phosphate et de l'ADP. Le glycérol-3-phosphate est oxydé en Dihydroxyacétone phosphate avec formation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par l'action de la glycérol-3-phosphate oxydase (GPO). Par la suite, le H₂O₂ se combine au 4-aminoantipyrine et au 4-chlorophénol pour former la quinonéimine (rose) sous l'action catalytique de la peroxydase

(POD). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des triglycérides présents dans l'échantillon (Fossati et principe, 1982).



ii) Mode opératoire

10µl d'eau distillée, d'étalon (standard), de plasma ou extrait lipidique ont été introduit dans les tubes blancs, étalons et essais respectivement. Dans chaque tube, 1000µl de réactif a été ajouté ensuite les tubes ont été homogénéisés et incubé à 25°C pendant 10 minutes. Les absorbances ont été lus contre le blanc à 505nm.

iii) Expressions des résultats

La concentration des triglycérides dans le plasma et dans les hépatocytes a été déterminée respectivement par la relation :

$$\text{Triglycérides} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{absorbance de l'échantillon}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{Concentration de l'étalon}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Triglycérides hépatiques} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ de foie} \right) \\
 &= \frac{\text{Volume du filtrat (dL)}}{\text{Masse du foie (g)}} \times \text{Triglycérides hépatiques} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right)
 \end{aligned}$$

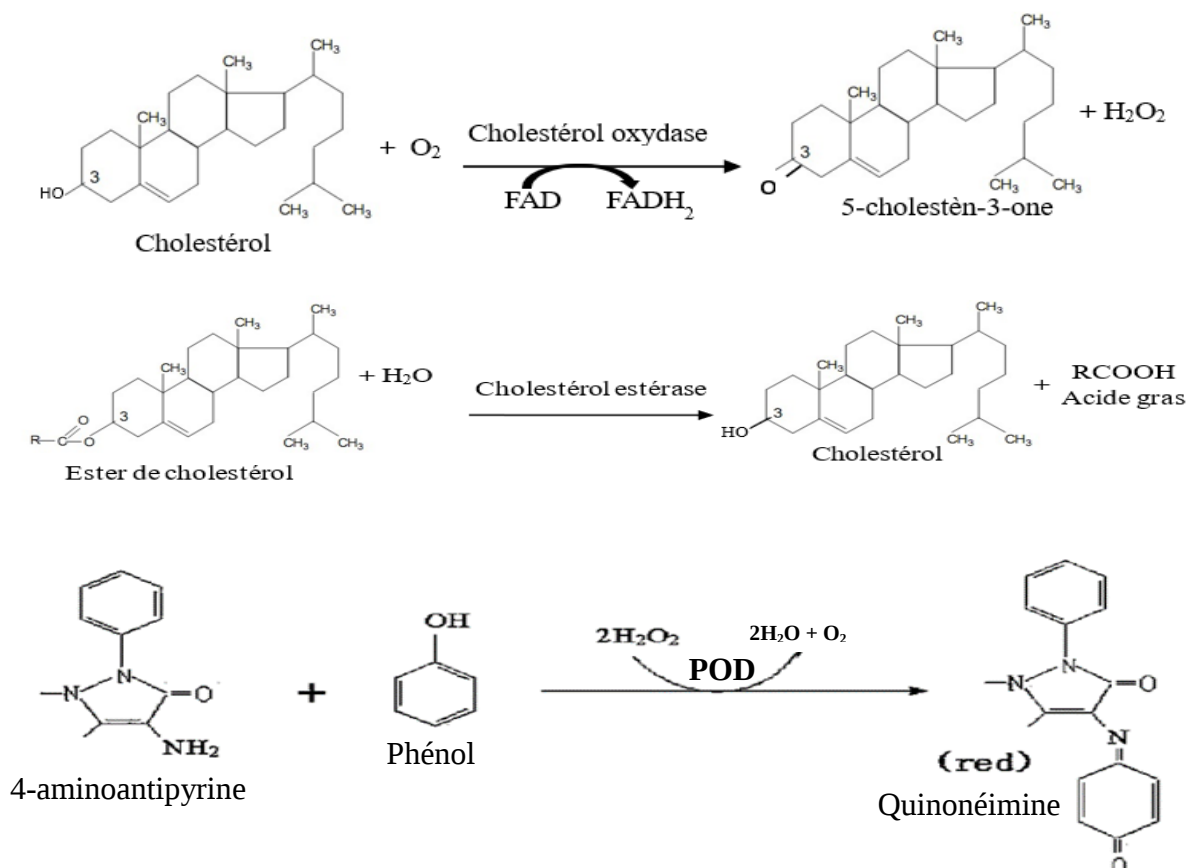
Concentration de l'étalon = 200 mg/dL,

➤ Dosage du Cholestérol Total

Le dosage du cholestérol total a été fait à l'aide du kit *Labcare* selon la méthode de **Tietz, 1964** dans le plasma.

i) Principe

Les esters de cholestérol sont hydrolysés sous l'action du cholestérol estérase en cholestérol libre et en acides gras. Le cholestérol libre est oxydé en 4-cholesten-3-one et peroxyde d'hydrogène par le cholestérol oxydase. Le phénol et le 4-aminoantipyrine se combinent avec le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase (POD) pour donner la quinonéimine de coloration rouge absorbant entre 500-550nm. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol total dans l'échantillon.



ii) Mode opératoire

Dans les tubes blanc, standard, essai ; 10μL d'eau distillée, de cholestérol standard (étalon) et le plasma à analyser ont été introduit respectivement. Par la suite, 1000μL de réactifs a été ajouté aux tubes. Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 10 minutes à 25°C. Les absorbances ont été lues contre le blanc à 505nm.

iii) Expression des résultats

La concentration du cholestérol total dans le plasma a été déterminée par la relation :

$$\text{Cholestérol total } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{absorbance de l'échantillon}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{Concentration de l'étalon}$$

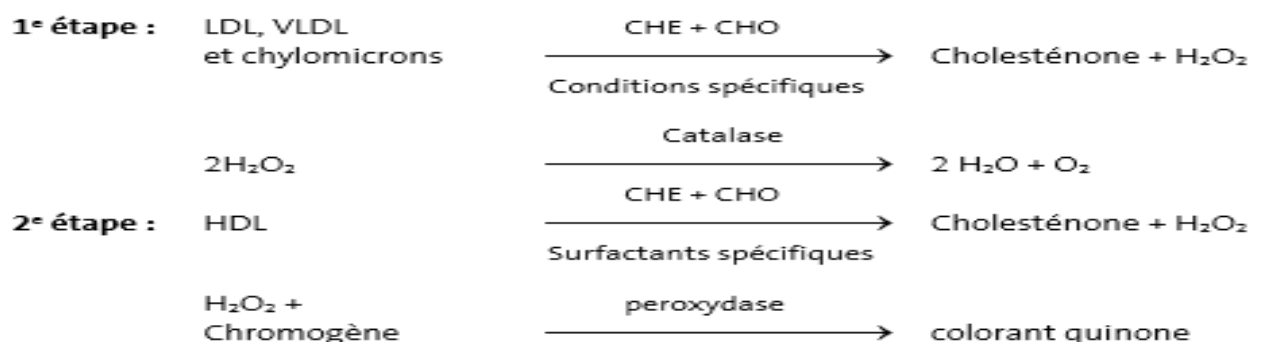
Concentration de l'étalon = 200 mg/dL

➤ Dosage du HDL-cholestérol

La détermination du taux plasmatique de HDL-cholestérol a été effectuée à l'aide du kit HDL-cholestérol *liquicolor* dans le plasma par méthode directe selon **Gordon et al., 1977**.

i) Principe

Le dosage combine deux étapes spécifiques : lors de la 1^{ère} étape, les chylomicrons, les VLDL et le cholestérol LDL libèrent du cholestérol libre et des acides gras sous l'action du cholestérol estérase (CHE). Le cholestérol libre soumis à l'action enzymatique du cholestérol oxydase (CHO) produit du peroxyde d'hydrogène et du cholesténone. Le peroxyde d'hydrogène formé est dégradé par la catalase. Lors de la 2^{ème} étape, le cholestérol restant de la fraction HDL est solubilisé par un détergent (surfactant) et sous l'action combinée du CHE et CHO, le cholestérol HDL produit du peroxyde d'hydrogène et du cholesténone. Le couple peroxyde d'hydrogène formé et chromogène (4aminoantipyrine+phénol) développe une réaction colorée proportionnelle à la concentration en HDL- cholestérol présent dans l'échantillon.



ii) Mode Opératoire

Dans les tubes correspondants, 10µL d'eau distillée, de standard (étalon) et d'échantillon ont été pipeté. 750µl du réactif 1 a été ajouté aux différents tubes, les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 5 min à 37°C à l'aide du bain Marie par la suite 250µL du réactif 2 a été ajouté aux différents tubes puis ces tubes ont été homogénéisés et incubés à 37°C. Les absorbances ont été lues contre le blanc à 593 nm.

iii) Expression des résultats

La concentration du HDL-cholestérol dans le plasma a été déterminée par la relation :

$$\text{Cholestérol HDL} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{absorbance de l'échantillon}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{Concentration de l'étalon}$$

Concentration de l'étalon = 150 mg/dL

➤ Estimation du cholestérol LDL

La détermination du taux de LDL-cholestérol a été faite suivant la méthode de **Friedewald et al. (1972)**, exprimé en mg/dL.

Cholestérol-LDL (mg/dL) = Cholestérol total – Cholestérol-HDL – (Triglycérides/5).

II.2.4.2. Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur les marqueurs du stress oxydant

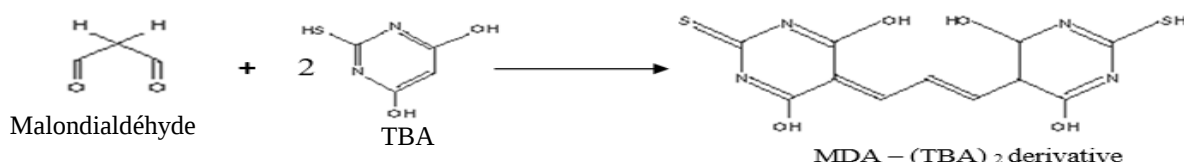
Les marqueurs du statut oxydatif à quantifier étaient le MDA, le NO et la catalase, dans les compartiments suivants : homogénat Foie, plasma et hémolysât.

➤ Malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde produit issu de la peroxydation lipidique, a été évalué dans le plasma et les homogénats du foie selon la méthode de **Yagi, 1976**.

i) Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm, suivant l'équation ci-dessous:



ii) Mode opératoire

Dans des tubes à essai en verre et à vis, ont été introduits 100µL d'homogénat ou de plasma, 400µL de réactif TBA lesquels ont été fermés hermétiquement, le mélange a été chauffé au bain marie à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts pour permettre l'évacuation des gaz formés lors de la réaction, les tubes ont été centrifugés (1500g, 5 minutes) et l'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm. La concentration du MDA a été déterminée en utilisant son coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon = 1,53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

iii) Expression des résultats

Les concentrations en MDA ont été exprimées dans le plasma et les homogénats de Foie respectivement comme suit :

$$\text{Concentration MDA (mol/L)} = \text{DO} / \epsilon \cdot L$$

$$\text{Concentration MDA (mol/L/g de foie)} = \text{DO} \cdot V / \epsilon \cdot L \cdot v \cdot P$$

V : Volume du surnageant obtenu après centrifugation de l'homogénat *v* : Volume d'échantillon *P* : Poids du foie broyé (g) ϵ : coefficient d'extinction moléculaire) : $1,53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

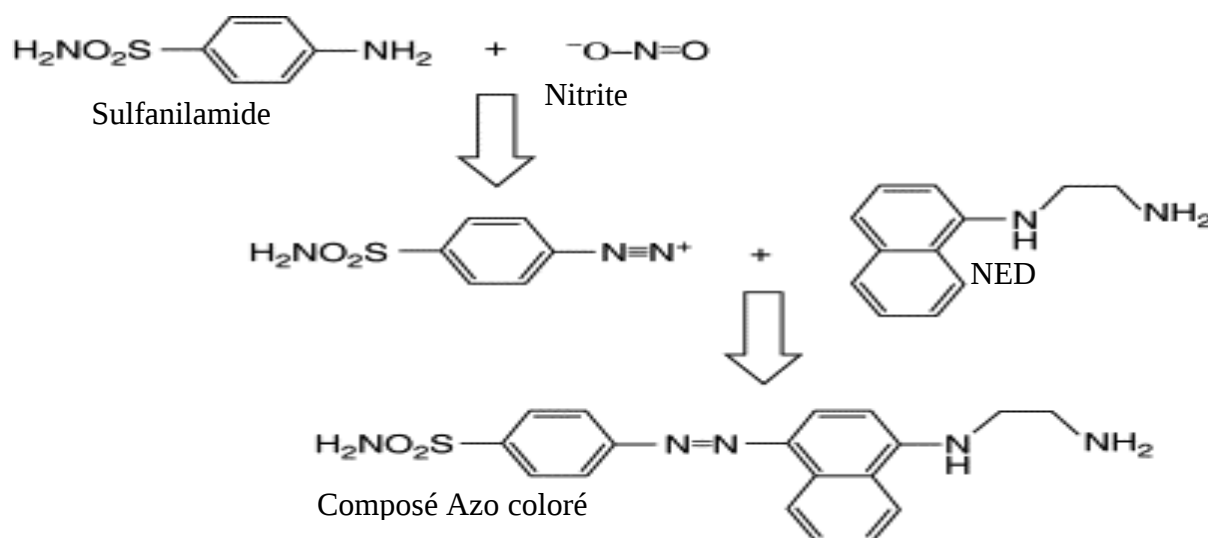
La préparation du réactif TBA ainsi que sa composition sont mentionnées en **Annexe 2**.

➤ Oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique a été évalué dans le plasma selon la méthode de **Griess et al., 1879**.

i) Principe

Cette méthode est basée sur la réaction entre le nitrite (composé stables et non volatile issu de l'oxydation du NO et utilisé comme indicateur indirect de la production de NO) et un réactif de Griess. Par la réaction de diazotation, le nitrite réagit avec l'acide sulfanilique (sulfanilamide) pour former un sel de diazonium en milieu acide (Acide phosphorique). Ce sel réagit ensuite avec le Dichlorure de N-1- Naphtyléthylène diamine (NED) pour former un composé azo coloré rose-rouge. La couleur est mesurée à 540nm et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de nitrites présents dans l'échantillon.



ii) Mode Opératoire

Dans les tubes correspondants, ont été introduits 100µL d'échantillon et 100µL d'eau distillée, par la suite 100µL de sulfanilamide a été ajouté. Les tubes ont été incubés pendant 10min à température ambiante à l'abri de la lumière. Après incubation, 100µL d'une solution de Dichlorure de N-1-Naphtyléthylène diamine (NED) a été ajouté et les tubes ont à nouveau

été incubés pendant 10min à température ambiante à l'abri de la lumière (400µL d'eau distillée a été ajouté pour compléter le volume pour une meilleure lecture). Les absorbances ont été lus contre le blanc à 540nm. La concentration du NO a été déterminée en utilisant son coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon = 39500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

iii) Expression des résultats

La concentration plasmatique de NO a été déterminée par la relation :

Concentration du NO (μM) = $\text{DO}/\epsilon \text{ L}$

ϵ : coefficient d'extinction moléculaire du NO : $39500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ - La préparation de la solution de NED et de la solution de sulfanilamide est présentée en **Annexe 3**.

➤ Marqueur du système anti-oxydant

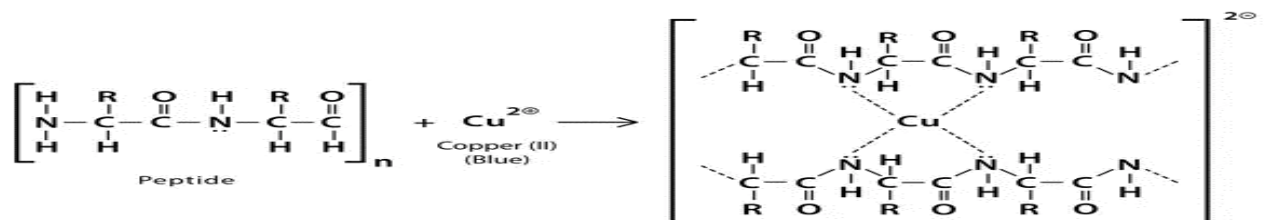
Le marqueur antioxydant évalué a été la catalase dans les hémolysats selon la méthode de **Sinha (1972)**. La quantification des protéines a été préalablement effectuée selon la méthode **Gornall et al., (1949)** avant le dosage de la catalase.

➤ Dosage des protéines totales

Le taux de protéines totales a été évalué à travers la méthode de **Gornall et al., 1949**

i) Principe

Cette méthode est basée sur la réaction entre le tartrate alcalin (réactif de biuret) et la solution protéique en présence du sel cuivrique, avec pour formation un complexe cuivre-protéine (bleu-violet) qui absorbe à 540nm dont la coloration est proportionnelle à la quantité



- BSA 5mg/mL
- NaCl 0,9%
- Réactif de biuret (préparation en **Annexe 4**)

iii) Mode opératoire

950 µL de NaCl et 200 µL de réactif de biuret ont été ajouté à 50µL d'échantillon (hémolysât) et 50µL d'eau distillée contenu dans les tubes correspondants. Les tubes ont été par la suite homogénéisés et incubés à température ambiante pendant 30min à l'abri de la lumière. Les absorbances sont lus à 540nm.

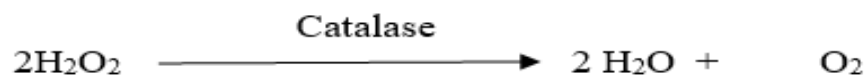
iv) Expression des résultats

La concentration en protéines totales est obtenue à partir de la droite de régression linéaire issue de la courbe d'étalonnage (**Annexe 5**) réalisée avec la solution de BSA. Le dispositif est dans le tableau d'étalonnage en **Annexe 4**.

➤ Catalase

i) Principe

Elle est basée sur la présence de la catalase dans l'échantillon qui réduit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O et O_2 . En présence du peroxyde d'hydrogène restant, le dichromate chauffé réagit avec l'acide acétique pour former le chromure d'acétate (bleu-vert). La réaction est suivie par la diminution de l'absorbance à 620 nm toutes les 30 secondes pendant 60 secondes. L'activité de la catalase proportionnelle à la DO est déterminée grâce à la courbe d'étalonnage.



ii) Mode opératoire

Un volume de 50 μL d'hémolysât ou homogénat a été ajoutée à 700 μL de tampon phosphate (0,01 M ; pH 7). A ce mélange a été ajoutée 200 μL de peroxyde d'hydrogène et la réaction a été stoppée après 30 ou 60 secondes par l'addition d'1mL du réactif dichromate 5% /acide acétique (1 :3). Tous les tubes ont été chauffés dans un bain Marie pendant 10 min, puis refroidis et l'absorbance a été lue à 620 nm. L'étalonnage de peroxyde d'hydrogène a été préparé et traité dans les mêmes conditions que les essais.

Les réactifs, la préparation du tampon phosphate et la solution de dichromate-acide acétique et le tableau d'étalonnage sont présentés en **Annexe 6**.

iii) Expression des résultats

Le dosage des protéines a été réalisé afin de déterminer l'activité de la catalase. L'activité de la catalase a été exprimée en mM de peroxyde d'hydrogène consommés/min/mg de protéines en utilisant la courbe d'étalonnage présenté dans l'**Annexe 7**.

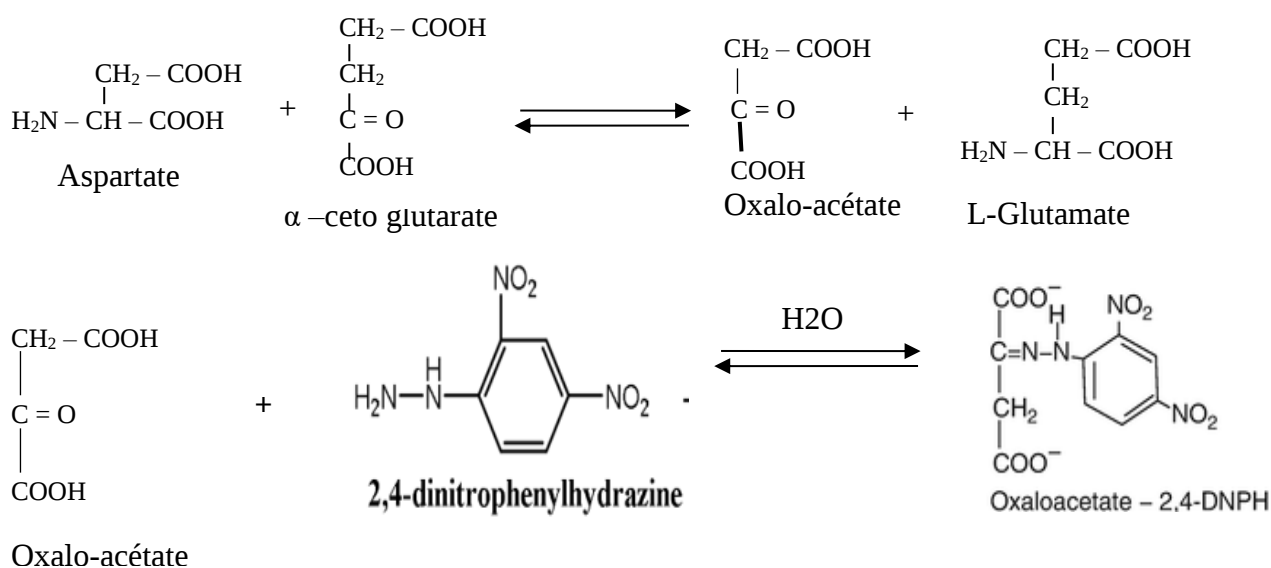
II.2.4.3. Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur les marqueurs de l'atteinte hépatique

L'évaluation de l'atteinte hépatique a été effectuée à travers la détermination du taux des transaminases dans le plasma selon la méthode de **Reitman et Franckel (1957)**.

➤ Dosage de l'ASAT plasmatique

i) Principe

L'Aspartate amino transférase (ASAT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'aspartate à l'acide α -céto glutarate formant ainsi le L-glutamate et l'oxalo-acétate. L'oxalo-acétate réagit avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) pour donner le 2,4-dinitrophénylhydrazone (complexe de couleur brun). L'intensité de la coloration mesurée à 505nm contre le blanc est directement proportionnelle à l'activité de l'ASAT présent dans l'échantillon.



ii) Mode Opératoire

Dans les tubes correspondants aux tubes blancs et tubes essais, 100 μ L de solution de substrat a été introduit, puis 20 μ L d'échantillon et 20 μ L d'eau distillée ont été ajoutés dans les tubes essais et les tubes blancs respectivement. Après homogénéisation, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 1heure et 100 μ L du réactif de coloration (DNPH) a été ensuite ajoutée. Les tubes ont été laissés incuber à température ambiante pendant 20 minutes puis 1mL de NaOH a été introduit dans les tubes pour arrêter la réaction. Les absorbances ont été lues à 505 nm. L'étalonnage a été réalisé suivant le Tableau mentionné en **Annexe 8**.

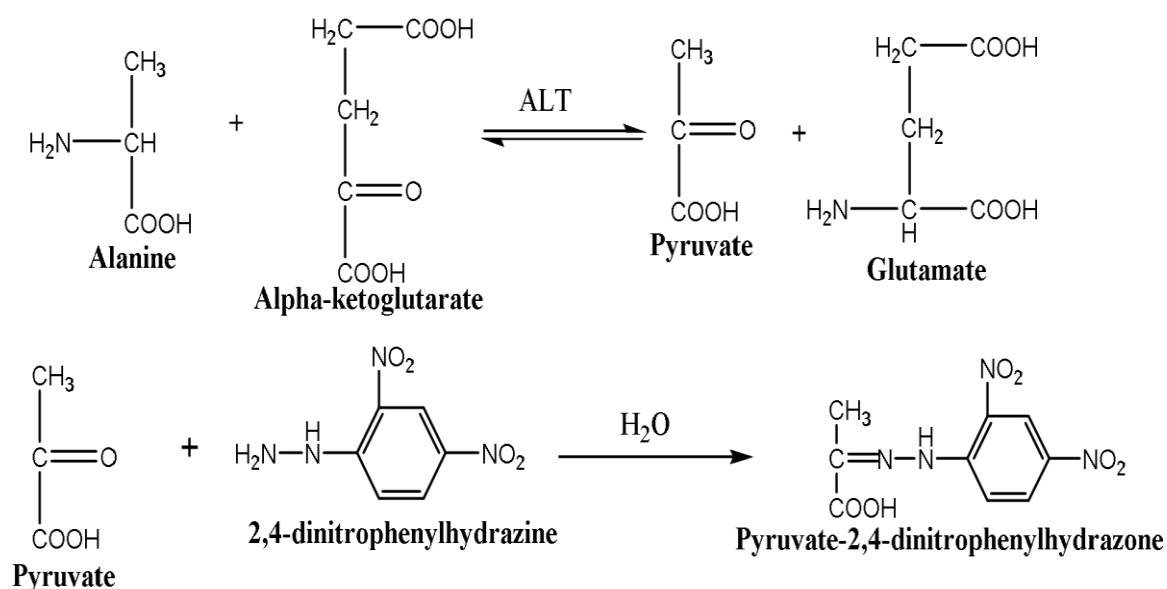
iii) Expression des résultats

L'activité de l'ASAT a été déterminée en utilisant l'équation de régression linéaire issue de la courbe d'étalonnage (en **Annexe 9**). Cette activité a été exprimée en unité internationale par litre (UI/L).

➤ Dosage de l'ALAT plasmatique

i) Principe

L'Alanine amino transférase (ALAT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'alanine à l'acide α -cétooglutarate formant ainsi le L-glutamate et le pyruvate. Le pyruvate réagit avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) pour donner le 2,4-dinitrophénylhydrazone (complexe de couleur brun). L'intensité de la coloration mesurée à 505nm contre le blanc est directement proportionnelle à l'activité de l'ALAT présent dans l'échantillon.



ii) Mode Opératoire

Dans les tubes correspondant aux tubes blancs et tubes essais, 100 μ L de solution de substrat a été introduit, puis 20 μ L d'échantillon et 20 μ L d'eau distillée ont été ajoutés dans les tubes essais et blancs respectivement. Après homogénéisation, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 30 minutes et 100 μ L du réactif de coloration (DNPH) a été ensuite ajouté. Les tubes ont été laissé incuber à température ambiante pendant 20 minutes puis 1mL de NaOH a été introduit dans les tubes pour arrêter la réaction. Les absorbances ont été lues à 505 nm. L'étalonnage a été réalisé suivant le tableau mentionné en **Annexe 8**.

iii) Expression des resultats

L'activité de l'ALAT a été déterminée en utilisant l'équation de régression linéaire issue de la courbe d'étalonnage (**Annexe 9**). Cette activité a été exprimée en unité internationale par litre (UI/L).

II.2.4.4. Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur les marqueurs pro et anti-inflammatoires

Les Marqueurs inflammatoires à doser ont été TNF-alpha, interleukine-1 β , interleukine 10. La quantification des cytokines inflammatoires dans les échantillons a été déterminée par le test ELISA à l'aide du kit *Microelisa Stripplate* correspondant à chaque marqueur selon les instructions du fabricant.

i) Principe

Ce test consiste à piéger les antigènes d'intérêt entre un anticorps de capture fixé au fond de la microplaque (**Figure 9a**) et un anticorps de détection couplé à une enzyme qui se fixe au complexe formé « anticorps de capture-antigène recherché-anticorps de détection » (**Figure 9c**). L'enzyme préalablement couplée à l'anticorps de détection catalyse la réaction chimique qui transforme le chromogène en composé coloré (**Figure 9d**). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de l'antigène recherché dans l'échantillon.



Figure 9: Description du test ELISA sandwich

ii) Mode opératoire

Dans les puits standard et échantillon, 50 μ L de standard et 10 μ L d'échantillon ont été ajoutés respectivement, puis 40 μ L de diluant d'échantillon a été ajoutée dans les puits. 100 μ L de réactif HRP-conjugué a été introduit dans chaque puits ; les puits ont été couverts par une bande adhésive et incubé pendant 60 minutes à 37°C par la suite une solution de lavage de 400 μ L a été introduite dans les puits pour effectuer le lavage de chaque puits puis cette solution de lavage a été aspirée. Le processus de lavage a été répété 4 fois pour un total de 5 lavages et au dernier lavage, la plaque a été retournée et épongé sur du papier. 50 μ L de solution de chromogène A et 50 μ L de solution de chromogène B ont été introduits dans chaque puits en mélangeant délicatement. Par la suite les puits ont été incubés pendant 15 minutes à 37°C et protégés de la lumière ; puis 50 μ L de la solution d'arrêt a été ajoutée dans chaque puits en tapotant doucement pour un mélange complet.

Les absorbances ont été lues à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque de micro titration.

iii) Expression des résultats

Les concentrations de chaque cytokine ont été déterminées en utilisant l'équation de régression linéaire issue de la courbe d'étalonnage (**Annexe 10**) tracé à partir des concentrations standard et des DO respectifs.

La composition du kit et la préparation de la solution de lavage sont mentionnés en **Annexe 11**.

II.2.4.5. Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur les paramètres hématologiques des rats

L'évaluation des paramètres hématologiques a été réalisée à l'aide d'un auto analyseur (*Counter*) de marque *MINDRAY BC2800*.

i) Principe

La méthode est basée sur la cytométrie pour le comptage des cellules ; sur la colorimétrie pour le dosage de l'hémoglobine et sur l'impédance qui est une résistance qui mesure le volume des cellules.

ii) Mode Opératoire

Le sang contenu dans les tubes EDTA a été introduit dans un hématimètre qui aspire 30µL de sang total et par la suite procède au comptage des cellules sanguines (hématies, leucocytes, lymphocytes, monocytes et les plaquettes) ainsi que le dosage du taux d'hémoglobine.

iii) Expression des résultats

Les paramètres hématologiques ont été exprimés en $10^3/\mu\text{L}$.

II.2.4.6. Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur l'aspect histopathologique du foie des rats

Les coupes histologiques ont été faites suivant la méthode de (**Smith et Bruton, 1977**)

i) Principe

L'analyse histologique est la technique de préparation des tissus et/ou organes en vue de leur observation au microscope. Elle comprend différentes étapes dont la fixation, la recoupe, la déshydratation, l'inclusion, la coupe, la coloration, le montage et l'observation.

ii) Mode Opératoire

a) Fixation

L'objectif de la fixation est de maintenir les cellules et les constituants tissulaires dans un état aussi proche que possible de celui du vivant. La fixation a été effectuée en mettant les organes dans du formol 4 %.

b) Recoupe

Une fois les organes fixés, ils ont été « recoupés ». À cette étape, il a été question de couper le tissu de manière à lui donner une épaisseur inférieure à celle des cassettes de déshydratation. Les tissus coupés ont été déposés dans des cassettes étiquetées.

c) Déshydratation

La déshydratation, s'est déroulée en trois étapes successives. La déshydratation proprement dite, l'éclaircissement et l'imprégnation.

- **Déshydratation proprement dite**

Cette étape a pour but de débarrasser les échantillons de toute trace d'eau avant leur inclusion dans de la paraffine. Elle a consisté à laisser les tissus dans des bains d'alcool de concentrations croissantes respectives de 70 % (1 h), 95 % (1 h), 95 % (1 h 30), 100 % (1 h), 100 % (1 h 30), 100 % (2 h).

- **Eclaircissement**

L'éclaircissement a consisté à remplacer la solution de déshydratation qui est l'alcool par le xylène qui est un solvant miscible dans le milieu d'inclusion. Les cassettes ont séjourné dans deux bains de xylène consécutifs. Un premier bain de 1 h et un deuxième bain de 1 h 30 min.

- **Imprégnation**

Cette étape a consisté à introduire les organes dans un bain de paraffine en fusion pendant 4 h 30 min dans la station d'enrobage de marque *Microm Heidelberg*. Après cette dernière étape de la déshydratation suit l'inclusion.

d) Inclusion

L'inclusion est le procédé qui fournit un support externe aux tissus, ce qui permet la réalisation de fines coupes au microtome. Les tissus ont été placés selon une orientation précise (en diagonale) dans des moules en inox qui ont par la suite été remplis de paraffine en fusion. L'ensemble a été mis à solidifier sur une plaque réfrigérée pour en obtenir des blocs.

e) Coupe

La coupe des blocs de paraffine contenant les tissus a été réalisée à l'aide d'un microtome de marque *Reichert-Jung 2030*. L'épaisseur des rubans après coupe était de 5 μm . Une fois coupées, les sections de rubans ont été mises à déplier dans un bain-marie contenant de l'eau gélifiée à 45 °C. Elles ont été récupérées sur des lames de verre étiquetées et séchées à l'étuve à 45 °C, pendant 24 heures avant coloration.

f) Coloration

La coloration a pour but de mettre en évidence les différents éléments tissulaires et de les différencier entre eux afin de permettre l'étude de leur structure, de leur morphologie et des éventuelles modifications pathologiques. Avant l'étape de la coloration, les coupes ont d'abord été déparaffinées. Le protocole de déparaffinage est consigné dans le Tableau XXI (**Annexe 12**). Immédiatement après l'étape de déparaffinage, les lames portant les coupes de tissus ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Les étapes de cette coloration sont résumées dans le Tableau XXII (**Annexe 12**).

g) Montage

L'étape de montage entre lame et lamelle a directement suivi la coloration. Pour ce faire, quelques gouttes de résine synthétique de marque *Eukit* ont été déposées sur la lame portant la coupe colorée avant apposition d'une lamelle. Les coupes de tissus sur les lames ont ainsi été protégées et conservées. Les lames colorées à l'hématoxyline et à l'éosine puis montées ont été observées à différents grossissements, à l'aide d'un microscope optique de marque *Scientico STM-50* muni d'une caméra digitale de marque *Celestron 44421* connectée à un ordinateur pour la prise des microphotographies.

II.2.5. Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés en moyenne $\pm$ écart type. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel *statistical package for social sciences* (SPSS) version 26.0. Le test ANOVA à un facteur suivi d'un test *post-hoc* (LSD) montrant les significativités à $p < 0,05$ a été utilisé pour comparer les moyennes des différents groupes et le logiciel Excel a été utilisé pour tracer les différents graphes.

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 RESULTATS

L'analyse des données issues de cette session d'expérimentation a permis d'obtenir les résultats présentés

III.1.1 Validation de l'induction de la NAFLD

La vérification de l'installation de la NAFLD a été faite en exploitant la variation de poids pendant l'induction et la glycémie à la fin de l'induction et l'accumulation de triglycérides hépatiques.

III.1.1.1 Variation du Poids des rats au cours de l'induction de la NAFLD

Au cours de l'induction, la diète *high fat* (DEG) a entraîné une augmentation de la variation du poids des rats aux 36^{ième} ($p=0,026$), 48^{ième} ($p=0,021$) et 60^{ième} ($p=0,007$) jours comparativement aux rats nourris avec une diète normale (DN) (**Figure. 10**).

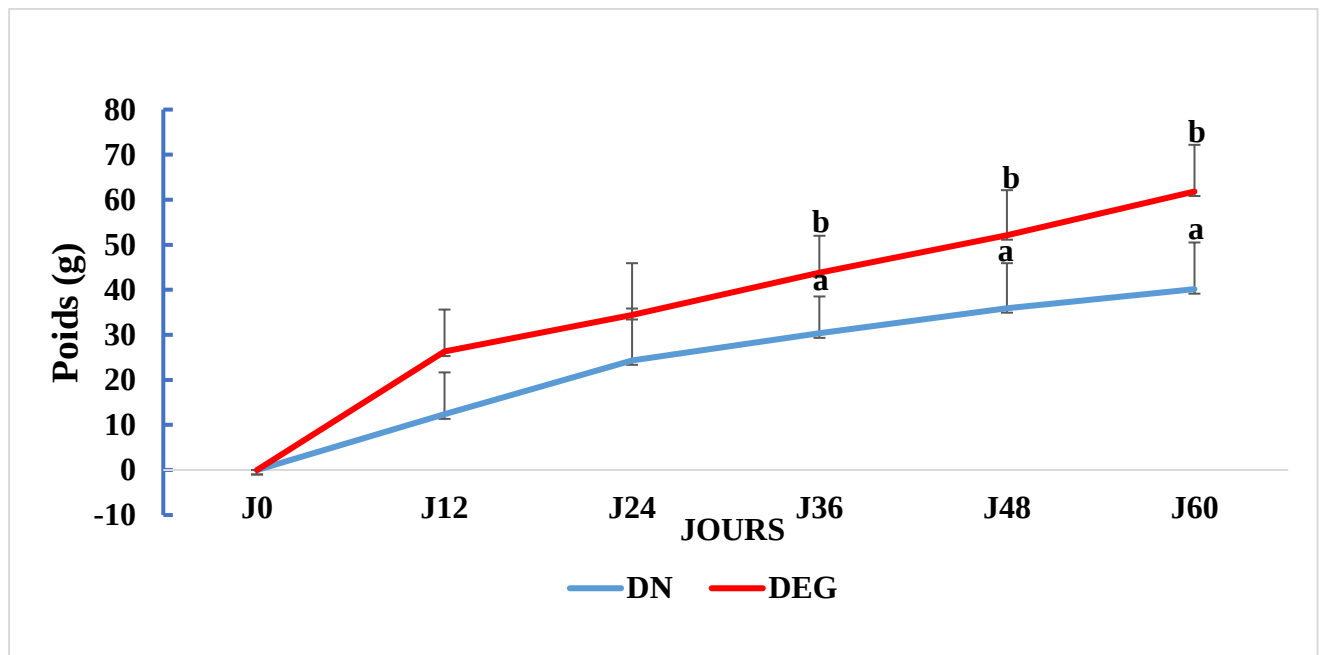


Figure 10: Effet de l'induction sur le Poids des rats

III.1.1.2 Glycémie des rats à la fin de l'induction de la NAFLD

Au bout de l'induction, a été observée une augmentation ($p=0,022$) de la glycémie des animaux du groupe nourris avec la diète *high fat* comparativement aux animaux nourris avec une diète normale (**Figure. 11**).

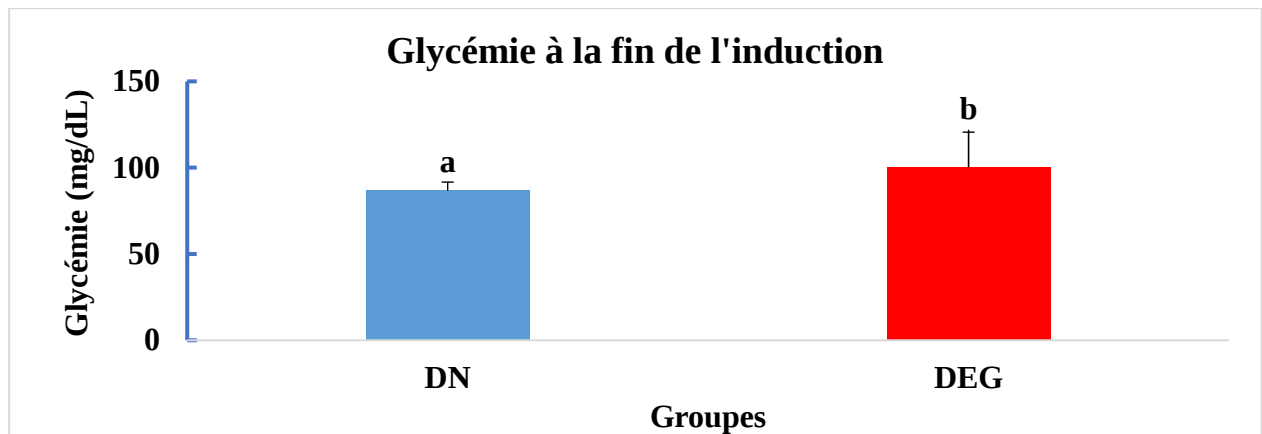


Figure 11: Effet de l'induction sur la glycémie des rats

III.1.1.3 Pourcentage des triglycérides hépatiques des rats NAFLD

Une augmentation ($p=0,001$) du taux de triglycérides hépatique a été notée chez les rats nourris avec une diète *high fat* comparativement au groupe de rats nourris avec diète normale après sacrifice des rats (Figure 12).

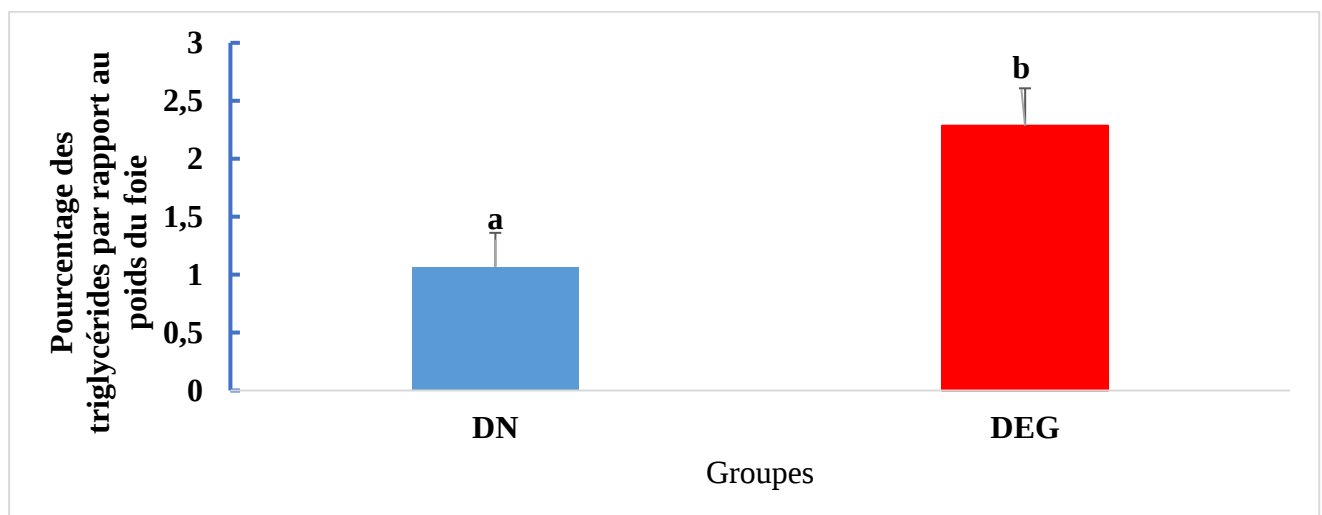


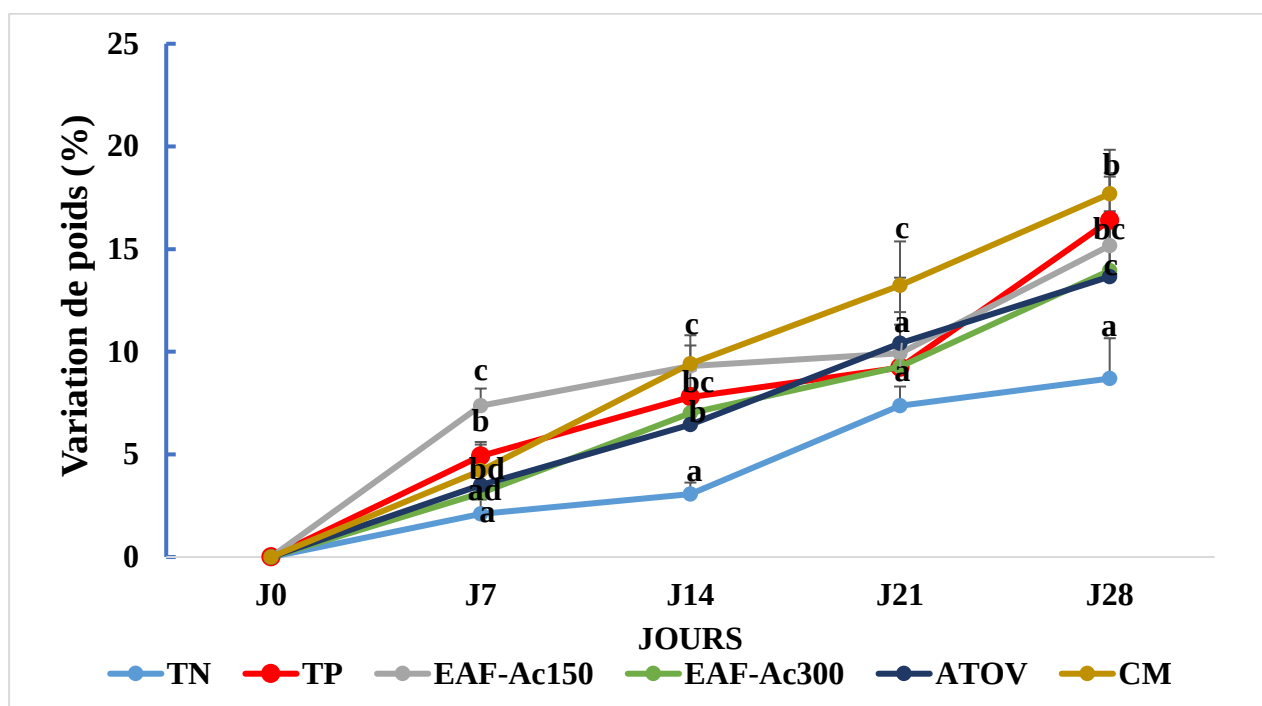
Figure 12: Effet de l'induction sur le taux de triglycérides hépatiques chez les rats

III.1.2 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur le métabolisme glucidique et lipidique chez les rats atteints NAFLD

L'effet sur le métabolisme glucidique et lipidique de l'extrait a été évalué à travers la variation du poids corporel, la glycémie, l'accumulation des triglycérides hépatiques et les paramètres du profil lipidique chez les rats atteints de NAFLD.

III.1.2.1 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*A.caulirhiza* sur la variation du poids corporel des rats

Il en ressort de la figure 13, une prise de poids au sein de chaque groupe de rats entre le début et la fin du traitement. Cependant, la prise de poids était significativement plus importante chez les rats du groupe TP comparativement à ceux du groupe TN. L'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* à la dose 150mgKg de Pc a entraîné au 7^{ième} jour une prise de poids significative par rapport au TP. Tandis que L'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* à la dose 300mgKg de Pc a entraîné une baisse de poids au 14^{ième} ($p>0,05$) et 28^{ième} ($p<0,05$) jours par rapport au TP. (Figure. 13).

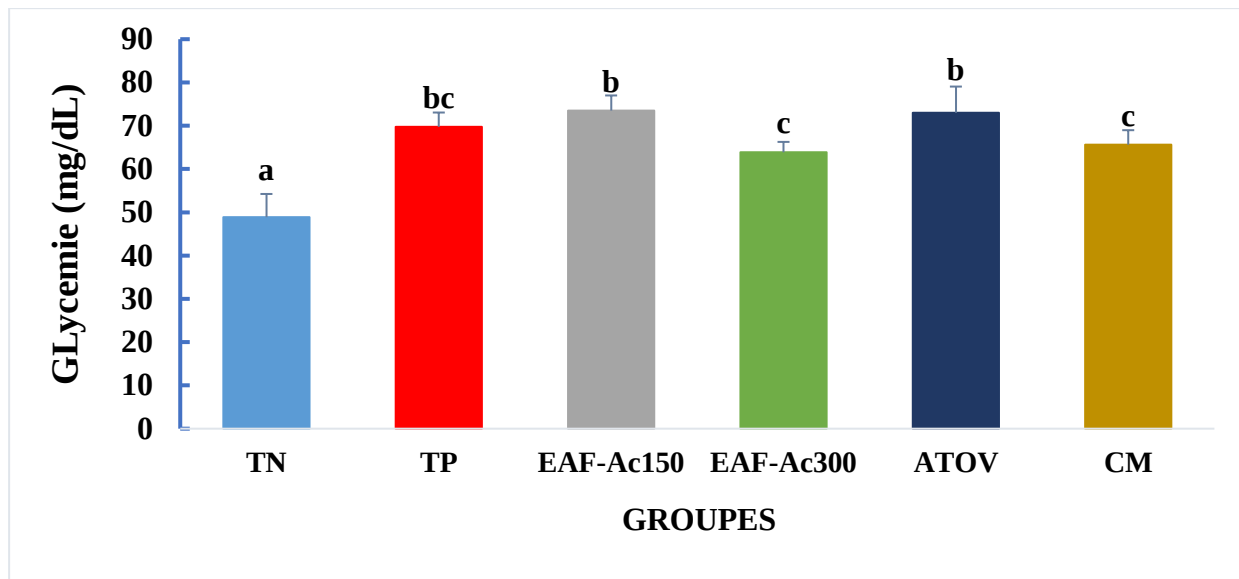


Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type. TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EAF-Ac150 : rats nourris avec le HFD + 150mg/kg de Pc d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (Ac) ; EAF-Ac300 : rats nourris avec le HFD + 300mg/kg de Pc d'extrait aqueux des feuilles d'Ac ; ATOV : rats nourris avec le HFD + 10mg/kg de Pc d'Atorvastatine ; CM : rats nourris avec le HFD + 200mg/kg de Pc de poudre de curcumine. Les points affectés des lettres a, b, c, d sont significativement différentes ($P<0,05$).

Figure 13: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur la variation du poids corporel des rats

III.1.2.2 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur la Glycémie des rats

La diète riche en graisse a entraîné une augmentation significative de la glycémie chez le groupe TP. Il a été observé que durant la période de traitement, aucun traitement (EAF-Ac 150 ($p=0,262$), EAF-Ac 300 ($p=0,066$), ATOV ($p=0,292$), CM ($p=0,186$)) n'a entraîné une baisse de la glycémie ($p>0,05$). (Figure. 14).

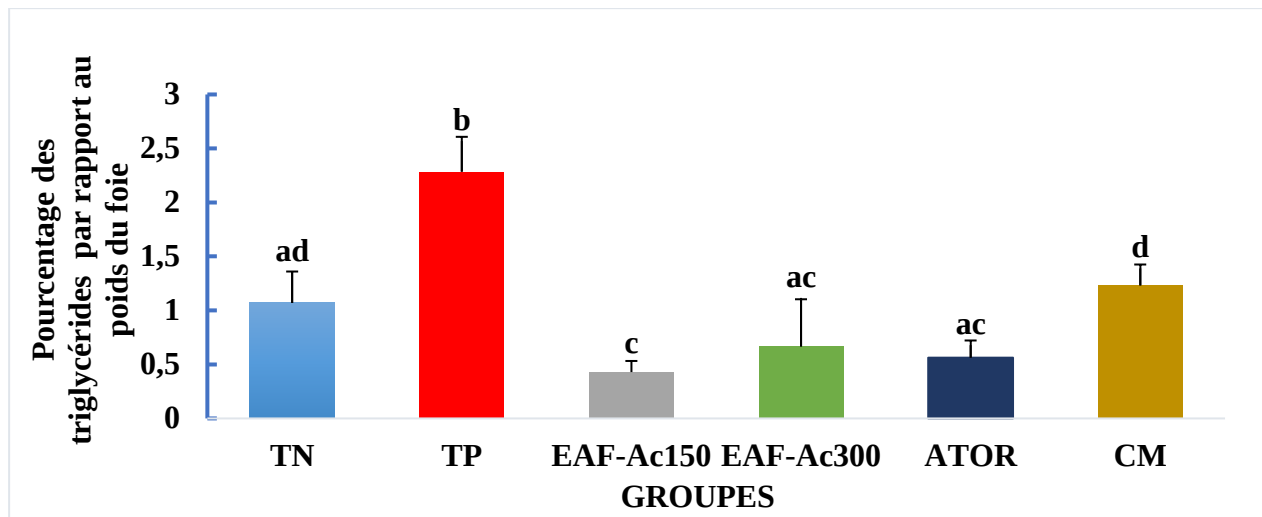


Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type. TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EAF-Ac 150 : rats nourris avec le HFD + 150mg/kg de Poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (Ac) ; EAF-Ac 300 : rats nourris avec le HFD + 300mg/kg de poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'Ac ; ATOV : rats nourris avec le HFD + 10mg/kg de poids corporel d'Atorvastatine ; CM : rats nourris avec le HFD + 200mg/kg de poids corporel de poudre de curcumine. Les points affectés des lettres a, b, c sont significativement différents ($P < 0,05$).

Figure 14: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur la glycémie des rats après traitement

III.1.2.3 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur l'accumulation des triglycérides hépatiques

La diète riche en graisse a favorisé l'accumulation des triglycérides dans les cellules hépatiques marquée par une augmentation du pourcentage de triglycérides hépatique dans le groupe TP ($p=0,001$) comparativement au groupe TN. L'administration de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* aux deux doses a entraîné une baisse de cette accumulation hépatique par rapport au TP (). Cette baisse était comparable à celle observée dans les groupes références. (Figure. 15).

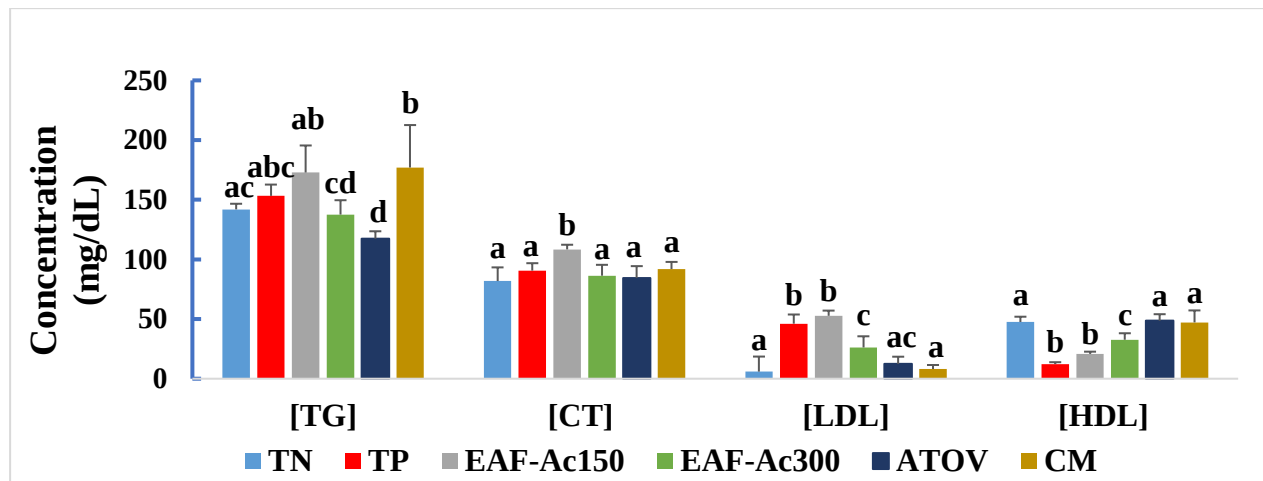


Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type. TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EAF-Ac 150 : rats nourris avec le HFD + 150mg/kg de Poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (Ac) ; EAF-Ac 300 : rats nourris avec le HFD + 300mg/kg de poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'Ac ; ATOV : rats nourris avec le HFD + 10mg/kg de poids corporel d'Atorvastatine ; CM : rats nourris avec le HFD + 200mg/kg de poids corporel de poudre de curcumine. Les points affectés des lettres a, b, c sont significativement différents ($P < 0,05$).

Figure 15: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur l'accumulation hépatique des triglycérides chez les rats NAFLD

III.1.2.4 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur quelques paramètres du profil lipidique

La diète *high fat* n'a pas entraîné l'augmentation plasmatique des triglycérides et du cholestérol total ($p > 0,05$), mais a par contre entraîné une augmentation du LDL-cholestérol et une baisse du taux de HDL dans le groupe TP ($p < 0,05$) comparativement au groupe TN. L'administration de l'extrait à la dose 300mg/kg de poids corporels n'a pas modifié le taux de triglycérides et de cholestérol total comparativement au groupe TP, par contre l'administration à la dose 150mg/kg de poids corporels a entraîné une augmentation ($p < 0,05$) du cholestérol total comparée aux autres groupes. L'extrait à la dose 300mg/kg a entraîné une baisse ($p < 0,05$) du taux de LDL et une augmentation ($p < 0,05$) du taux de HDL. Bien que cette augmentation soit moindre par rapport à celle observée dans les groupes références. (Figure. 16).



Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type. TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EAF-Ac 150 : rats nourris avec le HFD + 150mg/kg de Poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (Ac) ; EAF-Ac 300 : rats nourris avec le HFD + 300mg/kg de poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'Ac ; ATOV : rats nourris avec le HFD + 10mg/kg de poids corporel d'Atorvastatine ; CM : rats nourris avec le HFD + 200mg/kg de poids corporel de poudre de curcumine. Les points affectés des lettres a, b, c sont significativement différents ($P < 0,05$).

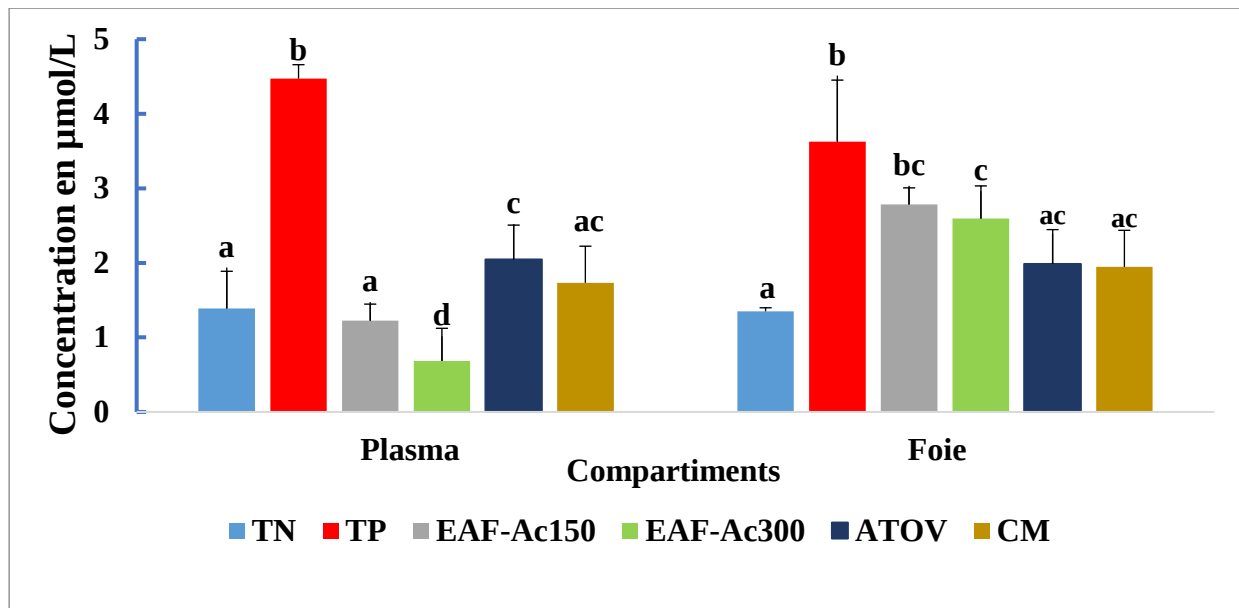
Figure 16: Effet de l'extrait aqueux sur le métabolisme lipidique

III.1.3 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur quelques marqueurs du stress oxydant chez les rats atteints de NAFLD

L'effet de l'extrait aqueux des feuilles sur le stress oxydant chez les rats atteints de NAFLD a été évalué à travers le taux de Malondialdéhyde, taux d'oxyde nitrique (NO) et l'activité de la catalase.

III.1.3.1 Effet de l'extrait aqueux sur le taux de Malondialdéhyde plasmatique et hépatique

La figure 17 présente l'effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur le taux de Malondialdéhyde issu de la peroxydation lipidique. Il en ressort que dans le plasma et le foie, la concentration en MDA était élevée dans le groupe TP comparativement au groupe TN ($p=0,001$). Dans le plasma, on observe une baisse de la concentration en MDA dans les groupes à l'extrait 150mg/kg de Pc ($p=0,001$) ($1,22 \pm 0,28$) $\mu\text{mol/L}$ et 300mg/kg de Pc ($p=0,001$) ($0,68 \pm 0,22$) $\mu\text{mol/L}$ par rapport au TP ($4,47 \pm 0,18$) $\mu\text{mol/L}$ tandis que dans le foie, seul l'extrait à la dose EAF-Ac300 ($2,59 \pm 0,43$) $\mu\text{mol/L}$ a entraîné une baisse ($p=0,042$) de la concentration en Malondialdéhyde par rapport au TP ($3,62 \pm 0,82$) $\mu\text{mol/L}$. De plus on observe une baisse significative de la concentration en MDA dans les groupes références (ATOR et CM) par rapport aux groupes extraits dans le foie (**Figure. 17**).

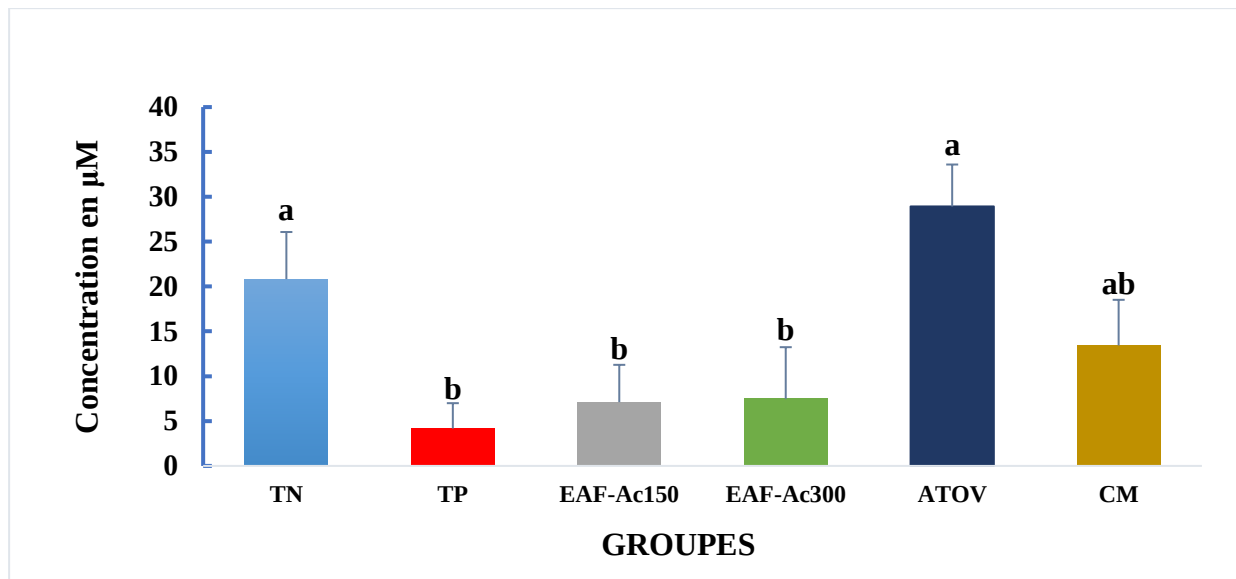


Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type. TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EAF-Ac 150 : rats nourris avec le HFD + 150mg/kg de Poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (Ac) ; EAF-Ac 300 : rats nourris avec le HFD + 300mg/kg de poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'Ac ; ATOV : rats nourris avec le HFD + 10mg/kg de poids corporel d'Atorvastatine ; CM : rats nourris avec le HFD + 200mg/kg de poids corporel de poudre de curcumine. Les points affectés des lettres a, b, c sont significativement différents ($P < 0,05$).

Figure 17: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur le taux de MDA

III.1.3.2 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur le taux plasmatique d'oxyde nitrique (NO)

Il en ressort de la Figure 18 que la diète *high fat* a causé une baisse significative du NO chez les rats du groupe TP comparativement à ceux du groupe TN. Le taux plasmatique de NO n'a pas été modifié par l'administration des extraits ($p > 0,05$). Par contre, l'atorvastatine, médicament de référence a entraîné une augmentation ($p < 0,05$) du taux plasmatique du NO par rapport aux groupes extraits et l'atorvastatine a été plus efficace que l'extrait aqueux de poudre de curcumine (**Figure 18**).

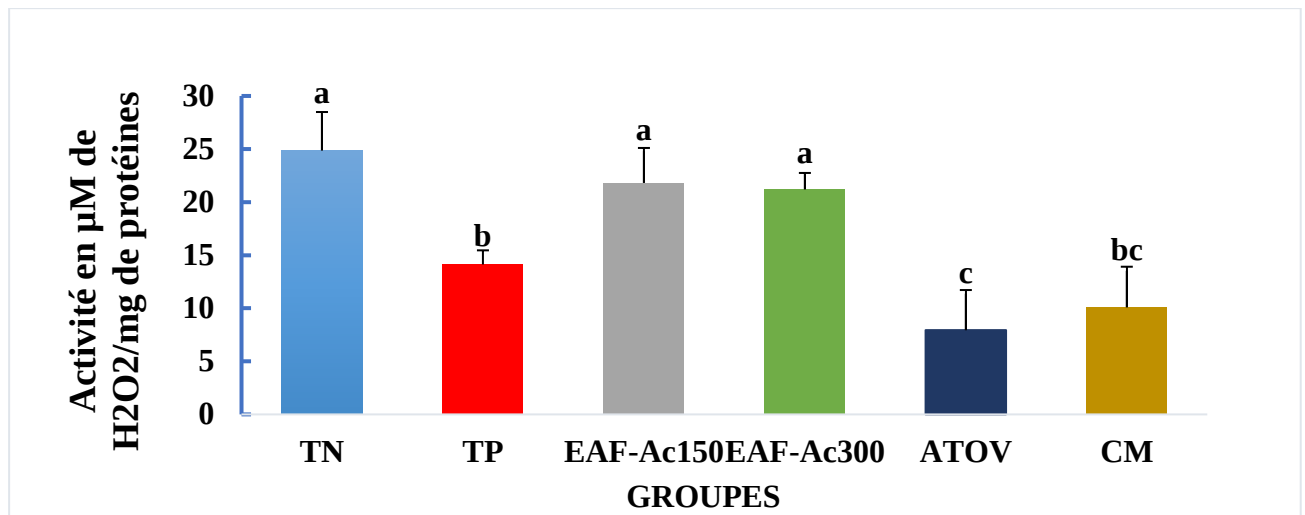


Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type. TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EAF-Ac 150 : rats nourris avec le HFD + 150mg/kg de Poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (Ac) ; EAF-Ac 300 : rats nourris avec le HFD + 300mg/kg de poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'Ac ; ATOV : rats nourris avec le HFD + 10mg/kg de poids corporel d'Atorvastatine ; CM : rats nourris avec le HFD + 200mg/kg de poids corporel de poudre de curcumine. Les points affectés des lettres a, b, c sont significativement différents ($P < 0,05$).

Figure 18: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur le taux de NO plasmatique

III.1.3.3 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur l'activité de la catalase

Le résultat consigné dans la Figure 19 montre que la diète riche en graisses a causé une diminution significative de l'activité de la catalase chez les rats du groupe TP comparativement à ceux du groupe TN. L'administration de l'extrait aqueux aux deux doses a boosté ($p < 0,05$) l'activité de la catalase aux différentes valeurs respectives de $21,81 \pm 3,28 \mu\text{M}/\text{mg}$ et $21,20 \pm 1,53 \mu\text{M}/\text{mg}$ par rapport au TP ($14,12 \pm 1,33 \mu\text{M}/\text{mg}$) tandis que l'atorvastatine et l'extrait de poudre de curcumine ont conduit plutôt à une baisse ($p < 0,05$) de l'activité de la catalase par rapport aux groupes extraits et même par rapport au groupe TP (**Figure. 19**).

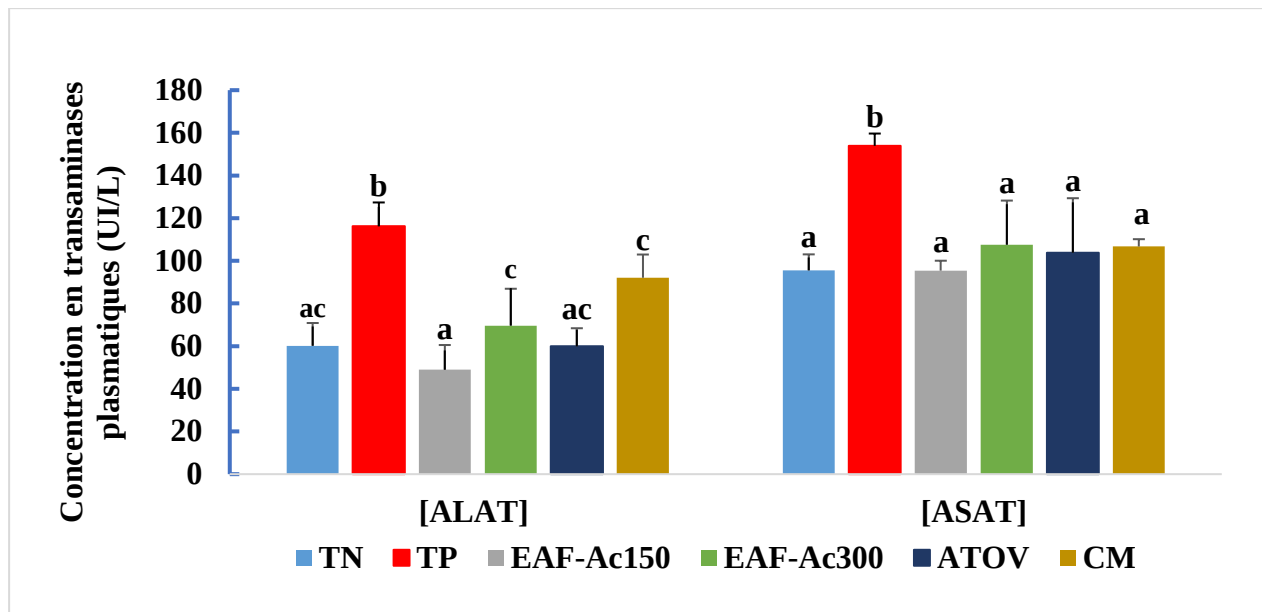


Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type. TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EAF-Ac 150 : rats nourris avec le HFD + 150mg/kg de Poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (Ac) ; EAF-Ac 300 : rats nourris avec le HFD + 300mg/kg de poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'Ac ; ATOV : rats nourris avec le HFD + 10mg/kg de poids corporel d'Atorvastatine ; CM : rats nourris avec le HFD + 200mg/kg de poids corporel de poudre de curcumine. Les points affectés des lettres a, b, c sont significativement différents ($P < 0,05$).

Figure 19: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur l'activité de la catalase

III.1.4 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur les transaminases chez les rats atteints NAFLD

La Figure 20 présente l'effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur le taux des transaminases chez les rats. Il en ressort que la diète riche en graisse a entraîné une augmentation ($p=0,001$) de l'activité des enzymes hépatiques ALAT et ASAT chez les rats du groupe TP comparativement à ceux du groupe TN. Le taux de transaminases ALAT et ASAT, a diminué ($p=0,0001$) dans les groupes recevant l'extrait aqueux aux deux doses 150mg/kg de Pc ($48,95 \pm 11,58$ UI/L et $95,40 \pm 4,64$ UI/L) et 300mg/kg de Pc ($69,63 \pm 17,27$ UI/L et $107,57 \pm 20,66$ UI/L) par rapport au TP ($116,22 \pm 11,13$ et $153,89 \pm 5,77$ UI/L). Concernant l'ALAT, la dose 150mg/kg de Pc a été plus efficace. Les médicaments de référence ont également entraîné une diminution ($p < 0,05$) des enzymes ALAT et ASAT comparables aux groupes traités à l'extrait (**Figure 20**).



Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type. TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EAF-Ac 150 : rats nourris avec le HFD + 150mg/kg de Poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (Ac) ; EAF-Ac 300 : rats nourris avec le HFD + 300mg/kg de poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'Ac ; ATOV : rats nourris avec le HFD + 10mg/kg de poids corporel d'Atorvastatine ; CM : rats nourris avec le HFD + 200mg/kg de poids corporel de poudre de curcumine. Les points affectés des lettres a, b, c sont significativement différents ($P < 0,05$).

Figure 20: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur le taux des transaminases

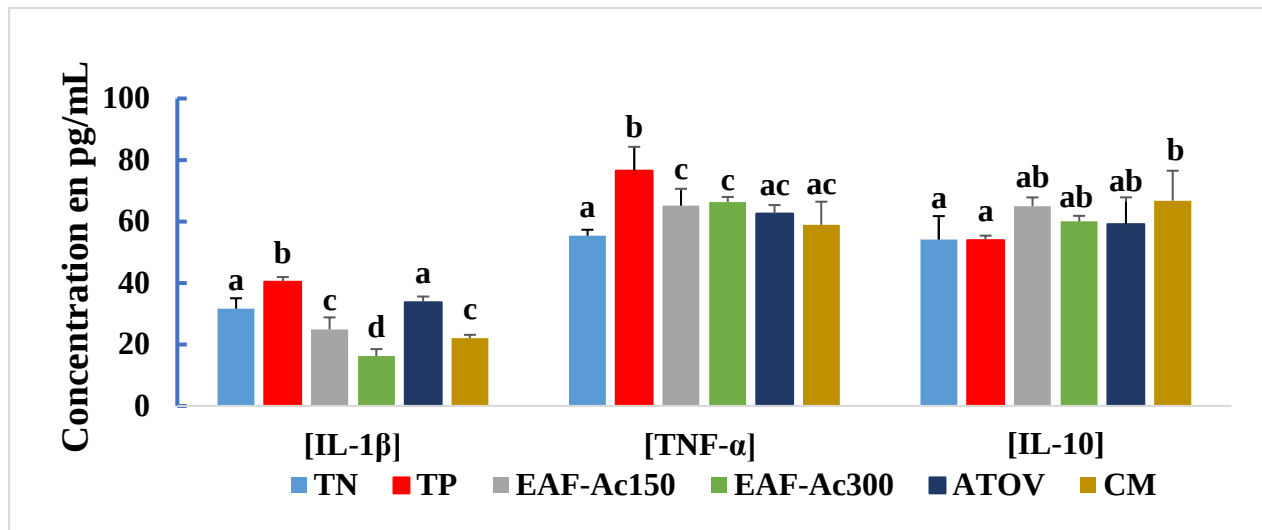
III.1.5 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur quelques marqueurs inflammatoires et sur quelques paramètres hématologiques chez les rats atteints de NAFLD

Les marqueurs inflammatoires et les paramètres hématologiques ont permis d'évaluer l'effet de l'extrait aqueux des feuilles sur le système inflammatoire des rats atteints de NAFLD

III.1.5.1 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur quelques marqueurs inflammatoires biochimiques chez les rats atteints de NAFLD

L'effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* a été évalué sur quelques marqueurs immuno-inflammatoires et les résultats sont consignés dans la Figure 21. La diète *high fat* a entraîné une élévation ($p < 0,05$) du taux des marqueurs pro-inflammatoire, TNF- α et IL-1 β et n'a entraîné aucune modification du taux d'IL-10 (marqueur anti-inflammatoire) chez les rats du groupe TP par rapport à ceux du groupe TN. L'extrait aqueux des feuilles aux deux doses a entraîné une baisse ($p < 0,05$) du taux de TNF- α et IL-1 β ($65,18 \pm 5,44$ et $24,87 \pm 3,92$; $66,36 \pm 1,61$ et $16,21 \pm 2,26$) pg/mL respectivement) chez les rats comparativement au groupe TP ($76,54 \pm 7,73$ et $40,36 \pm 1,55$) pg/mL), cette baisse était plus importante à l'extrait à la dose 300mg/kg de Pc. Une augmentation ($p > 0,05$) du taux d'IL-10 a été observée dans les groupes

traités à l'extrait à la dose 150 mg/kg ($64,94 \pm 2,87$ pg/mL) et à la dose 300mg/kg ($60,04 \pm 1,78$ pg/mL) par rapport au groupe TP ($53,92 \pm 1,46$ pg/mL) (**Figure 21**).



Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type. TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EAF-Ac 150 : rats nourris avec le HFD + 150mg/kg de Poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (Ac) ; EAF-Ac 300 : rats nourris avec le HFD + 300mg/kg de poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'Ac ; ATOV : rats nourris avec le HFD + 10mg/kg de poids corporel d'Atorvastatine ; CM : rats nourris avec le HFD + 200mg/kg de poids corporel de poudre de curcumine. Les points affectés des lettres a, b, c sont significativement différents ($P < 0,05$).

Figure 21: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur quelques marqueurs inflammatoires biochimiques

III.1.5.2 Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur quelques paramètres hématologiques chez les rats atteints de NAFLD

L'effet de l'extrait aqueux des feuilles sur quelques paramètres hématologiques des rats est présenté dans le Tableau 3. La diète *high fat* a favorisé la baisse ($p=0,003$) du taux de globules blancs et de lymphocytes chez les rats du groupe TP comparativement à ceux du groupe TN. Une augmentation ($p < 0,05$) du taux de globules blancs et de lymphocytes a été noté ainsi qu'une augmentation ($p > 0,05$) des granulocytes et une baisse non significative du taux de monocytes chez les rats traités à l'extrait à la dose 150mg/kg de Pc tandis que l'extrait à la dose 300mg/kg de Pc n' a entrainé aucune modification ($p > 0,05$) du taux de globules blancs et de monocytes mais a entrainé une augmentation ($p < 0,05$) du taux de lymphocytes et de granulocytes comparativement au groupe TP (**Tableau. 3**).

Tableau 3: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur les paramètres hématologiques

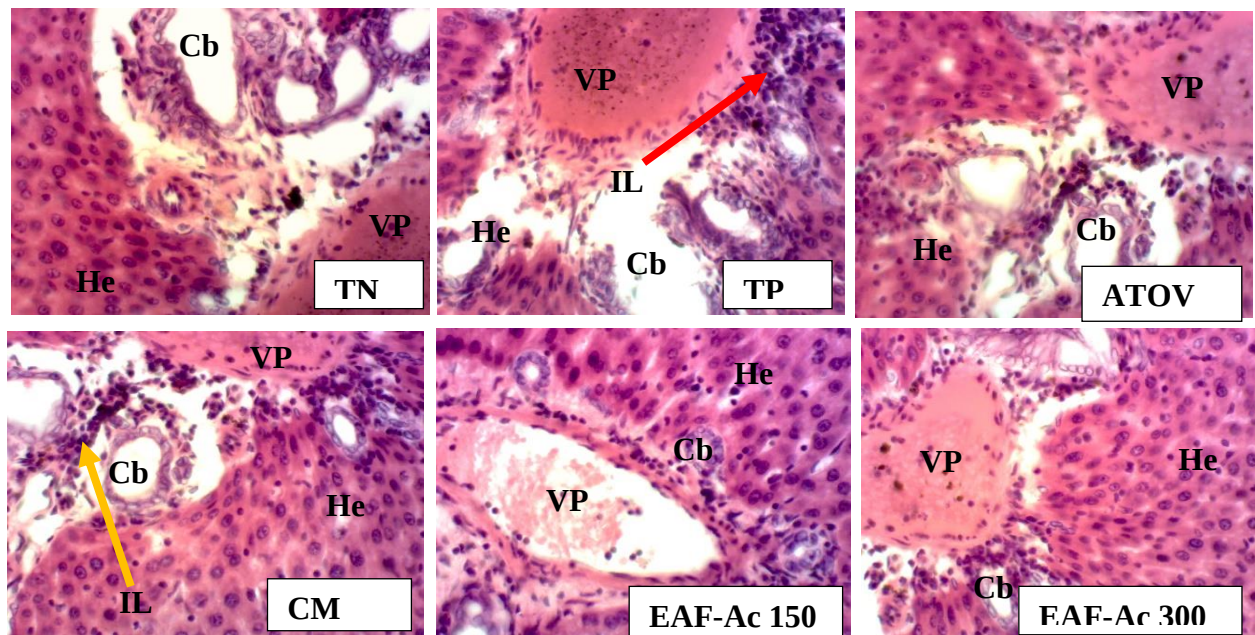
Groupes / Paramètres	TN	TP	EAF-Ac 150	EAF-Ac300	ATOV	CM
Globules blancs (10³/µL)	5,02±0,73 ^a	3,68±0,11 ^b	6,28±0,12 ^c	3,47±0,19 ^b	5,51±0,37 ^{ac}	5,1±0,57 ^a
Lymphocytes (10³/µL)	2,38±0,09 ^{ad}	0,65±0,1 ^b	3,91±0,73 ^c	2,28±0,05 ^d	1±0,21 ^b	3,005±0,53 ^a
Monocytes (10³/µL)	0,72±0,1 ^a	0,73±0,02 ^a	0,66 ±0,12 ^a	0,69±0,11 ^a	0,39±0,03 ^b	1,55±0,23 ^c
Granulocytes (10³/µL)	3,34±0,79 ^a	2,65±0,95 ^a	4,26±0,6 ^{ab}	5,13±0,59 ^b	5,12±0,42 ^b	3,53±0,88 ^a

Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes ± écart-type. TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EAF-Ac 150 : rats nourris avec le HFD + 150mg/kg de Poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (Ac) ; EAF-Ac 300 : rats nourris avec le HFD + 300mg/kg de poids corporel d'extrait aqueux des feuilles d'Ac ; ATOV : rats nourris avec le HFD + 10mg/kg de poids corporel d'Atorvastatine ; CM : rats nourris avec le HFD + 200mg/kg de poids corporel de poudre de curcumine. Les points affectés des lettres a, b, c sont significativement différents (P<0,05).

III.1.6. Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur l'aspect histopathologique du foie chez les rats atteints de NAFLD

La Figure 22 présente l'effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur l'architecture du foie. Sur le plan Microscopique, une infiltration leucocytaire a été observée chez les rats du groupe TP comparativement à ceux du groupe TN. Les rats traités à l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* aux deux doses n'ont présenté aucune infiltration leucocytaire par rapport aux rats du groupe TP. L'architecture du foie des rats traités à l'atorvastatine était s

emblable à celle des rats traités aux extraits tandis que la poudre de curcumine a causé une infiltration leucocytaire par rapport aux groupes extraits (**Figure 22**).



TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EAF-Ac 150: rats nourris avec le HFD + 150mg/kg de Pc d'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* (Ac) ; EAF-Ac 300: rats nourris avec le HFD + 300mg/kg de Pc d'extrait aqueux des feuilles d'Ac ; ATOV : rats nourris avec le HFD + 10mg/kg de Pc d'Atorvastatine ; CM : rats nourris avec le HFD + 200mg/kg de Pc de poudre de curcumine ; Vp : Veine porte ; He : Hépatocyte ; Cb: Canalicule biliaire ; IL : Infiltration leucocytaire

Figure 22: Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur l'aspect histopathologique du foie

III.2 DISCUSSION

La NAFLD est un trouble hépatique associée au syndrome métabolique résultant des facteurs non alcooliques (l'accumulation de graisses) et de gravité croissante allant d'une stéatose hépatique simple à un carcinome hépatique (**Hossein et al., 2020**) ; plus de 5% du poids du foie est constitué de graisse chez les patients atteints de NAFLD. Malgré la prévalence croissante de la NAFLD, très peu de médicament sont recommandés et ceux disponibles pour l'aspect physiopathologique de la NAFLD (pioglitazone, vitamine E, Statines) sont limités dues aux complications associées (prise de poids, augmentation de la mortalité, insuffisance cardiaque) (**Pouwels et al., 2022, Pafili et al, 2021, Targher et al., 2020**). Actuellement, pour sa gestion seules les mesures hygiéno-diététiques sont recommandées mais ces dernières sont difficiles à maintenir sur le long terme. Compte tenu de cette difficulté mais également de l'inaccessibilité des médicaments modernes dans les pays en voie de Développement, des stratégies alternatives doivent être développées. Selon, l'OMS, 80% de la population mondiale utilisent les plantes médicinales pour leurs soins primaires. En effet dans le cadre de la gestion des troubles métaboliques associés à la NAFLD, l'attention est de plus en plus portée sur les plantes médicinales et leurs effets comme médecine alternative car ces plantes médicinales retrouvés dans 80% des médicaments synthétiques, sont moins toxiques et de résistance plus faible (**Ngueguim et al., 2022 ; Huang et al., 2024**). Ainsi, dans l'optique de contribuer à la prise en charge de la NAFLD, nous nous sommes intéressés aux feuilles de la plante *Acmella caulirhiza* pour ces différents effets thérapeutiques. Cette étude visait à évaluer l'effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Acmella caulirhiza* (EAF-Ac) sur les taux sériques de certains marqueurs immuno-inflammatoires et oxydatifs dans un modèle animal nutritionnel de NAFLD. Il en ressort que l'EAF-Ac dans le contexte de NAFLD a la capacité de réduire l'accumulation des triglycérides hépatiques, de normaliser les marqueurs du métabolisme lipidique, booster le système antioxydant et le système immuno-inflammatoire des rats.

La NAFLD étant la conséquence d'une alimentation riche en graisses saturées et en sucres, nous avons utilisé une diète riche en graisses pour son induction chez les rats de souche *Wistar*, ce qui s'est soldé au bout de 8 semaines par une augmentation significative des paramètres de contrôle (le poids, la glycémie et le pourcentage de triglycérides hépatiques) chez les rats recevant la diète riche en graisses comparativement à ceux recevant la diète normale (**Figures 10, 11 et 12**), ce résultat confirme bien l'installation de la NAFLD et rejoint l'étude de **Zandani et al., (2022)** qui ont montré qu'un régime riche en graisse cause une augmentation de la masse corporelle et de l'hypertrophie du tissu adipeux, la littérature a également montré

que la consommation excessive en calorie active la ChREBP (carbohydrate response element binding protein) qui module la sensibilité à l'insuline d'où l'augmentation de la glycémie (**Petrescu et al., 2022**). Cependant, l'administration de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* à la dose de 300 mg/kg de Pc a atténué cette augmentation de poids (**Figure 13**) mais n'a eu aucun effet significatif sur la glycémie finale à la fin des 28 jours de traitement. Ceci pourrait être dû aux composés bioactifs tel que les polyphénols prouvé d'être capable de réduire l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux (**Onyango et al., 2017**).

La NAFLD est un trouble hépatique associée à la dyslipidémie. La diète riche en graisses a induit des changements dans le métabolisme lipidique qui sont démontrés à travers l'accumulation des triglycérides dans le foie et l'altération du profil lipidique plasmatique (**Figures 15 et 16**) (**Samar et al., 2020, Katsiki et al., 2016**). En effet les rats nourris à la diète riche en graisses (DEG) ont présenté un taux significativement élevé de LDL-c et bas de HDL-c ce qui augmente le risque de maladies coronariennes (**kim et al., 2011**) par rapport au groupe normal. Ces résultats concordent avec la littérature qui a montré qu'une consommation élevée d'un régime riche en graisses cause une dysfonction dans le métabolisme lipidique (**Wan-ju et al., 2020**). Cependant la prise de l'EAF-Ac a réduit ($p=0,0001$) le taux de triglycérides hépatiques, a restauré ($p=0,001$) le Taux de HDL-cholestérol et abaissé ($p=0,009$) le taux de LDL-cholestérol (**Figures 15 et 16**). Ce résultat rejoint celui de **Wang et al., (2015)**, qui ont montré que l'extrait de *Stellera chamaejasme L* améliore le métabolisme lipidique sérique et hépatique. En effet, l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* possède des composés bioactifs capable de diminuer l'expression du facteur de transcription SREBP-1c (sterol regulatory element- binding protein-1c) entraînant l'inhibition de l'expression des enzymes lipogènes ACC (Acétyl-CoA Carboxylase) et FAS (Fatty Acid synthase), liés à la synthèse des acides gras libres dans le foie (**Hossein et al., 2020**) ce qui inhibe la lipogenèse de *Novo* responsable de l'augmentation du taux de lipides hépatiques (**Liu et al., 2022**). De plus, les polyphénols présents dans l'extrait aqueux favorisent la phosphorylation de l'AMPK, médiateur énergétique qui contrôle le métabolisme lipidique au niveau cellulaire, qui active le PPAR- α responsable de l'activation de l'enzyme CPT-1 conduisant ainsi au transport amélioré des acides gras dans les mitochondries pour subir la β -oxydation (**Hang-Yu et al., 2021**).

L'accumulation excessive des triglycérides dans les hépatocytes menace l'intégrité du foie, organe assurant le métabolisme lipidique et aboutis à une toxicité qui endommage les mitochondries et favorise la formation des espèces réactives d'oxygène responsables du stress oxydatif (**Durand et al., 2021, Zakaria et al., 2021**). L'exposition des rats à la diète riche en

graisses a induit d'une part une augmentation ($p < 0,05$) du taux en MDA (**Figure 17**) et une diminution ($p > 0,05$) du taux de NO (**Figure 18**) comparativement au groupe TN. Ce résultat rejoint celui de **Mamun et al. (2019)** qui ont observé lors de l'induction de l'obésité que l'alimentation à haute teneur en graisses entraîne une augmentation des produits de la peroxydation lipidique. L'administration de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* aux deux doses a entraîné une baisse significative du taux de MDA (**Figure 17**), marqueur pro-oxydant issu de la peroxydation des lipides qui est responsable des dommages au niveau de la membrane cellulaire des hépatocytes causant ainsi une fuite des enzymes cytoplasmiques hépatiques (ALAT et ASAT) et une augmentation ($p > 0,05$) du NO (**Figure 18**), ce NO est un marqueur oxydant influencé par les dommages causés par la toxicité des lipides au sein des hépatocytes (**Rodriguez et al., 2015**).

D'autre part l'on a noté une baisse de l'activité de la catalase du groupe TP comparativement au groupe TN (**Figure 19**). Les résultats montrent que l'administration de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* aux deux doses a entraîné une augmentation à une valeur proche de la normale de l'activité de la catalase qui est l'enzyme responsable de la réduction du H_2O_2 en O_2 et en H_2O empêchant ainsi l'induction d'un stress oxydant. Ce résultat rejoint celui de **Dalwadi et al., (2023)** qui ont démontré que l'extrait aqueux des feuilles de Tamarinier, une plante médicinale, possède un effet anti-oxydant en augmentant l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase. En effet, les polyphénols tels que les flavonoïdes présents dans l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* boostent le niveau de défense antioxydant et réduisent le stress oxydatif via le facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf2) qui est le principal facteur de transcription maintenant l'équilibre redox cellulaire en modulant positivement l'expression des gènes impliqués dans la défense antioxydante (**Rodriguez et al., 2015**) de plus ces flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en donnant à ces derniers un atome d'hydrogène afin de produire des radicaux moins réactifs et stables (**Van de Wier et al., 2017**).

Les observations faites au niveau des enzymes hépatiques confirment que la diète riche en graisses a compromis l'intégrité du foie à travers un taux significativement élevé des enzymes ALAT et ASAT dans la circulation sanguine (**Figure 20**). Ce résultat similaire à ceux obtenus par d'**Efati et al., 2016** qui ont observé une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques au cours de l'induction de la stéatose hépatique non alcoolique avec un régime alimentaire riche en graisse. Toutefois, l'administration de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* aux deux doses a diminué ($p = 0,0001$) le taux d'ALAT et d'ASAT et a

ramené ces taux à des valeurs normales significativement identiques aux valeurs du groupe témoin (**figure 20**). **Tienoue et al. (2023)** dans une étude de toxicité subaiguë ont montré que l'extrait aqueux des parties aériennes d'*Acmella caulirhiza* a entraîné la diminution des activités des transaminases (ALAT et ASAT). La présence des composés bioactifs tels que les flavonoïdes (**Tienoue et al., 2023**) dans la plante d'*Acmella caulirhiza* qui ont la capacité de stabiliser la membrane hépatique endommagée confère à l'extrait un effet hépato-protecteur (**Syed et al., 2018**).

L'augmentation du taux de triglycérides hépatiques suivie d'un stress oxydant responsable du taux élevé des enzymes hépatiques peuvent conduire à un état inflammatoire qui se caractérise par une perte d'équilibre entre les cytokines pro et anti-inflammatoires, cet équilibre étant important pour la santé humaine et animale (**Cheng et al., 2018**). Dans le présent modèle, le régime riche en graisses a entraîné un état pro-inflammatoire à travers l'augmentation ($p=0,033$) des taux de TNF-alpha, d'IL-1beta et un taux d'IL-10 identique à celui du témoin négatif (**Figure 21**), similaire à celui de **Cheng et al., 2018**, qui ont constaté que le régime *high fat* augmente le niveau des cytokines pro-inflammatoires. L'administration de l'EA des feuilles d'*Acmella caulirhiza* aux deux doses a inhibé ($p<0,05$) l'expression des marqueurs pro-inflammatoires et a augmenté de façon non significative le taux d'IL-10. Ceci grâce à la présence dans l'extrait des flavonoïdes capables d'inhiber l'activation du facteur de transcription NF- κ B (**Huang et al., 2024**), ce qui conduit à la baisse de la production d'IL-1 β et de TNF- α dans les cellules de kupffer (macrophages) des hépatocytes. De même, les composés bioactifs tels que contenus dans l'extrait peuvent réduire la production de LPS qui favorisent l'inflammation médiée par le récepteur toll-like 4 dans l'axe intestin-foie (**Hang-Yu et al., 2021**). De plus, il a été prouvé que les substances phénoliques présentent des propriétés anti-inflammatoires démontrées par leur capacité à inhiber les médiateurs pro-inflammatoires (**Dalwadi et al., 2023**). Cette inflammation est induite par les cellules immunitaires.

En effet, les études ont montré qu'une accumulation excessive d'acides gras hépatiques conduit à un recrutement de cellules immunitaires. La diète *high fat* a entraîné une réponse immunitaire à travers l'augmentation non significative des monocytes comparativement au groupe témoin (**Tableau 3**). Par ailleurs, Les monocytes sont présents dans le sang et se différencient en macrophage. Dans les hépatocytes enflammées, ces macrophages sont responsables de la réponse immunitaire au cours de la NAFLD (**Ortiz-Lopez et al., 2022**). L'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* a entraîné une baisse non significative des monocytes, parallèlement une baisse des macrophages au sein du foie. Ce résultat peut

s'expliquer par la présence au sein de l'extrait aqueux des terpénoïdes capables de changer la polarisation phénotypique des macrophages passant de M1 (pro-inflammation) à M2 (anti-inflammatoire) par activation du PPAR α présent dans le foie, qui est un isoforme du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes limitant le développement de l'inflammation (Ortiz-Lopez *et al.*, 2022).

L'on a également noté une infiltration leucocytaire chez les rats nourris à la diète riche en graisses par rapport à ceux nourris à la diète normale (**Figure 22**). Ce résultat en accord avec celui de Mamun *et al.* (2019) qui ont montré que les dommages dus au stress oxydant et le dépôt graisseux entraînent une infiltration des cellules inflammatoires au sein du foie des rats nourris au régime riche en graisse. L'administration de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* a empêché cette infiltration leucocytaire qui est une suite logique de l'inflammation (Targher *et al.*, 2020). Ce résultat confirme la capacité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux d'*Acmella caulirhiza* grâce à sa richesse en polyphénols : flavonoïdes, terpénoïdes, coumarines (Azame *et al.*, 2019) molécules capables de moduler le recrutement des cellules immunitaires.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Parvenu au terme de notre étude, dont le but général était d'évaluer les effets sur quelques marqueurs du système immuno-inflammatoire de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur un modèle nutritionnel de stéatose hépatique non alcoolique induit chez les rats de souche *Wistar*. Il en ressort que :

- l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* a amélioré le métabolisme lipidique à travers la réduction de l'accumulation des triglycérides hépatiques, du taux de LDL et l'augmentation du taux de HDL chez les rats nourris au régime riche en graisse.
- l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* a renforcé le système de défense antioxydant et protégé l'intégrité du foie
- l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* possède des propriétés immuno-inflammatoires à travers la réduction du taux des marqueurs pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α) et des monocytes.

PERSPECTIVES

Afin d'améliorer ce travail, nous prévoyons d' :

- Evaluer l'effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur l'insulino-résistance associé à la NAFLD chez les rats
- Evaluer l'effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Acmella caulirhiza* sur les marqueurs de la fonction rénale des rats atteint de NAFLD
- Isoler les composés bioactifs responsables des effets évalués dans cette étude

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdul, R., & al. (2021).** Effets antioxydants et anti-inflammatoires potentiels des *Spilanthes acmella* et ces effets bénéfiques sur la santé : un examen. *International Journal Environment Research Public Health*; 2021:10-22.
- Alisi, A., Carpino, G., Oliveira, L., Panera, N., Nobili, V., & Gaudio, E. (2017).** The role of tissue macrophage-mediated inflammation on NAFLD pathogenesis and its clinical implications. *Mediators of inflammation* ; 2017(1), 8162421.
- Anty, R., & Philippe G. (2019).** Physiopathologie des stéatoses hépatiques métaboliques. *La Presse Médicale*; 48(12):1468-1483.
- Azame, T., Njinkio, B., & al. (2019).** Phytochemical screening, healing activity and Acute toxicity of *Musanga cecropioides* Root Sap and Aqueous Extract of the whole plant *Acmella caulirhiza* on Wistar rats. *Health Science and Diseases*; 21(1): 1-10.
- Bekolo, N., Sobguemezing, D., Aghoagni, G., & al. (2024).** Prévalence et Facteurs Associés à la Stéatose Hépatique chez les Patients Victimes d'Accident Vasculaire Cérébral. *Health Sciences Discover*; 25 (2) : 30-35.
- Bekolo, W., Etoga, M., Marina, B., Servais, E., Ndam, A., Malongue, A., & al. (2023).** Prevalence and Factors Associated with Hepatic Steatosis in Patients with Metabolic Syndrome in Cameroon: Cases of 4 Reference Hospitals. *Open Journal Gastroenterology*.;13:99-110.
- Berdja, S., Boudarene, L., Smail, L., Neggazi, S., Boumaza, S., Sahraoui, A., & Bouguerra, S. A. (2021).** Research Article *Scolymus hispanicus* (Golden Thistle) Ameliorates Hepatic Steatosis and Metabolic Syndrome by Reducing Lipid Accumulation, Oxidative Stress, and Inflammation in Rats under Hyperfatty Diet. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* ; 2021 : 1-14
- Bradbury, M. (2006).** Lipid Metabolism and Liver Inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*; 290: 194 –198.
- Bussmann, W., Paniagua-Zambrana, Y., & Njoroge, N. (2021).** Ethnobotany of mountain regions: Africa (Pp. 3-42). *Springer International Publishing*.
- Cheng, K., Song, Z., Chen, Y., Li, S., Zhang, Y., Zhang, H., Zhang, L., Wang, C., & Wang, T. (2018).** Resveratrol Protects Against Renal Damage via Attenuation of Inflammation and Oxidative Stress in High-Fat-Diet-Induced Obese Mice. *Inflammation*; 42(3): 937-945.
- Dalwadi, K., Rank, D., & Patel, V. (2023).** Effet améliorateur de l'extrait aqueux de feuilles de tamarin (*Tamarindus Indica*) contre l'inflammation via la modulation des médiateurs pro-

inflammatoires et anti-inflammatoires chez les rats Wistar. *Indian Journal of Pure Applied Biosciences*; 11(2), 50-60.

Durand, M., Coué, M., Croyal, M., Moyon, T., Tesse, A., Atger, F., Ouguerram, K., & Jacobi, D. (2021). Changes in key mitochondrial lipids accompany mitochondrial dysfunction and oxidative stress in NAFLD. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 2021(1):1-9.

Duriez, P. (2003). Mécanismes d'action des statines et des fibrates. *Thérapies*; 58(1), 5-14.

EASL, EASD, & EASO. (2016). EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*; 64(16): 1388-1402.

Efati, M., Khorrami, M., Zarei, A., & Raouf J. (2016). Induction of an Animal Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Using a Formulated High-Fat Diet. *Journal of Babol University Medical Science*; 18(11):57-62.

Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J., & LeBaron, N. (1951). Préparation d'extraits lipidiques à partir de tissu cérébral. *Journal of Biological Chemistry*. 191(2):833- 841.

Fossati, P., & Principe, L. (1982). Enzymatic colorimetric method to determination triglycerides. *Clinical chemistry*; 28(2077),1330.

Friedwald, W., Levy, R., & Fredrickson, D. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*; 18(6):499-502.

Gordon, T., Castelli, W., Hjortland, M., Kannel, W., & Dawber, T. (1977). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: The Framingham study. *American Journal of Medicine*; 62(5):704-714.

Gornall, A., Bardawill, C., & David, M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*; 177(2): 751-767.

Grunder, C., Grabherr, F., & Tilg, H. (2023). Non-alcoholic fatty liver disease: pathophysiological concepts and treatment options. *Cardiovascular research*; 119(9): 1787-1798.

Griess, P. (1879). Comments on the treatise of the HH. Weselsky and benedict about some azo compounds. *Report of the German Chemical Society*. 12(1):426-428.

Guo, X., Yin, X., Liu, Z., & Wang, J. (2022). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathogenesis and natural products for prevention and treatment. *International journal of molecular sciences*; 23(24), 15489.

- Haddad, Y. (2009).** Interventions thérapeutiques prometteuses dans un modèle in vivo de stéatohépatite non alcoolique Mémoire en Pharmacologie Université de Montréal.
- Hang, L., Gan, R., Shang, A., Mao, Q., Sun, Q., Wu, D., Geng, F., He, X., & Li, H. (2021).** Plant-Based Foods and Their Bioactive Compounds on Fatty Liver Disease: Effects, Mechanisms, and Clinical Application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 2021(1): 1-23.
- Hansan, R., Farzaei, M., & Khodarahmi, R. (2017).** Polyphénols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*; 20(2): 1700-1741.
- Hosseini, S., Maryam, R., Somayyeh, A., & al. (2020).** Effect of green coffee extract supplementation on serum adiponectin concentration and lipid profile in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized, controlled trial *Complementary Therapies in Medicine*; 2020 (49):102290.
- Huang, L., Tan, L., Lv, Z., Chen, W., & Wu, J. (2024).** Pharmacology of bioactive compounds from plant extracts for improving non-alcoholic fatty liver disease through endoplasmic reticulum stress modulation: A comprehensive review. *Heliyon*; 10(3):1-26.
- Huang, T., Behary, J., & Zekry, A. (2020).** Non-alcoholic fatty liver disease: a review of epidemiology, risk factors, diagnosis and management. *Internal medicine journal*; 50(9), 1038-1047.
- Juanola, O., Martínez-López, S., Francés, R., & Gómez-Hurtado, I. (2021).** Maladie du foie gras non alcoolique : métabolique, génétique, épigénétique et Facteurs de risque environnementaux. *Revue Internationale de Recherche Environnementale et santé publique*; 18(10):2-24.
- Katsiki, N., Dimitri, P., Mikhailidis, C., Mantzoros, S. (2016).** Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: an update. *Metabolism Clinical and Experimental*; 2016: 28-39.
- Kim, K. J., Lee, M. S., Jo, K., & Hwang, J. K. (2011).** Piperidine alkaloids from *Piper retrofractum* Vahl. protect against high-fat diet-induced obesity by regulating lipid metabolism and activating AMP-activated protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications*; 411 (1): 219-225.
- Kountouras, J., Kazakos, E., Kyrailidi, F., Polyzos, S. A., Zavos, C., Arapoglou, S., ... & Vardaka, E. (2023).** Innate immunity and nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of gastroenterology*; 36(3),244
- Kucera, O., & Cervinkova, Z. (2014).** Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World journal of gastroenterology*; 20(26): 8364.

- Kucera, O., Garnol, T., Lotkova, H., Stankova, P., Mazurova, Y., Hroch, M., ... & Cervinkova, Z. (2011).** The effect of rat strain, diet composition and feeding period on the development of a nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Physiological research*; 60(2),317-28.
- Kuzminova, V., Gribenyuk, V., Osovska, Y., & Knyazkova, I. (2016).** Hpertension artérielle, obésité et stéatose hépatique non alcoolique: y a-t-il un lien ?. *Journal of the Polish Society of Hypertension* ; 20(4):216-227.
- Leclère, P. (2019).** *Rôle du facteur de transcription circadien Krüppel-Like Factor 10 (KLF 10) dans le développement des complications hépatiques de l'obésité* (Doctoral dissertation, COMUE Université Côte d'Azur (2015-2019)).
- Lewis, E., Meydani, S., & Wu, D. (2019).** Regulatory Role of Vitamin E in the Immune System and Inflammation. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*; 71(4): 487–494.
- Liu, J., Shi, Y., Peng, D., Wang, L., Yu, N., Wang, G., & Chen, W. (2022).** *Salvia miltiorrhiza* Bge. (Danshen) in the Treating Non-alcoholic Fatty Liver Disease Based on the Regulator of Metabolic Targets. *Frontiers In Cardiovascular Medicine*; 9:842980.
- Luci, C., Bourinet, M., Leclère, P., Anty, R., & Gual, P. (2020).** Chronic inflammation in non-alcoholic steatohepatitis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Frontiers in Endocrinology*; 11:597648.
- Mahmoudi, A., Moallem, S. A., Johnston, T. P., & Sahebkar, A. (2022).** Liver protective effect of fenofibrate in nash/naflD animal models. *PPAR Research*; 2022(1), 5805398.
- Mamun, M., Faruk, M., Rahman, M., Nahar, K., Kabir, F., Alam, M., & Subhan, N. (2019).** High carbohydrate high fat diet induced hepatic steatosis and dyslipidemia were ameliorated by *Psidium guajava* leaf powder supplementation in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; 2019(1): 1-12.
- Meex, C., & Blaak, E. (2020).** Mitochondrial dysfunction is a key pathway that links saturated fat intake to the development and progression of naflD. *Molecular nutrition & food research*; 65(1), 1900942.
- Mundi, S., Velapati, S., Patel, J., Kellogg, A., Abu Dayyeh, K., & Hurt, T. (2020).** Evolution of naflD and its management. *Nutrition in clinical practice*; 35(1), 72-84.
- Murugan, S., Solanki, H., Purusothaman, D., Bethapudi, B., Ravalji, M., & Mundkinajeddu, D. (2021).** Safety evaluation of standardized extract of *Curcuma longa* (NR-

INF-02): A 90-day subchronic oral toxicity study in rats. *BioMedecine Research International*; 2021(1): 6671853.

Ngu, M., Norhayati, M., Rosnani, Z., & Zulkifli, M. (2022). Curcumin as adjuvant treatment in patients with non-alcoholic fatty liver (NAFLD) disease : A systematic review and meta-analysis. *Complementary Therapies in Medicine*; 68(3): 1-12.

Ngueguim, F., Djouwoug, N., Donfack, J., Gounoue, K., Mbatchou, A., Kamtchouing, P., & Dimo T. (2015). Acute and sub-acute toxicity of a lyophilised aqueous extract of the aerial part of *Spilanthes africana* Delile in rats, *Journal of Ethnopharmacology*; 172: 145-154.

Ngueguim, F., Jouonzo, J., Donfack, J., Gounoue, R., Djientcheu, J., Djouwoug, C., Fifen, R., Dzeufiet, P., & Dimo T. (2022). The Mixture Aqueous Extracts from *Oxalis corniculata* L. and *Acmella caulirhiza* Delile Accelerates Bone Healing in Fractured Rats. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research*; 17(3): 18-28.

Noubissi, K., Bayaga, H., & al. (2021). Phytochemical Screening and in vitro Evaluation of antioxydant and antibacterial properties of *Acmella caulirhiza*. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical*; 7(10): 546-550.

Nurhayati, T., Muhamad, F., Putri, T., Setiawan, S., Hanna, G., & Vita, M., (2024). Effects of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Liver Histopathology: A Systematic Review. *Journal of Nutrition and Metabolism*; 2024: 1-15.

Onyango, J., Onyancha, J., Onyuka, J., Ochora, J., Getonto, P., & Maina, C. (2017). Phytochemical studies of *acmella caulirhiza* and *spermacoce princeae* used by postpartum mothers in nyamira county, kenya. *International Journal of Scientific and Research Publications*; 7(8): 591-599.

Ortiz-Lopez, N., Fuenzalida, C., Dufeu, M., Pinto-Leon, A., Escobar, A., Poniachik, J., Roblero J., Valenzuela-Perez, L., & Beltran, C. (2022). The immune response as a therapeutic target in non-alcoholic fatty liver disease. *Frontiers Immunology*; 13:954869.

Pafili, K., & Roden, M. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans. *Molecular Metabolism*; 50(1):1-36

Peiseler, M., Schwabe, R., Hampe, J., kubes, P., heikewader, M, & Tacke, F. (2022). Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease-novel insights into cellular communication circuits. *Journal of hepatology*; 77(4): 1136-1160.

- Peng, C., Stewart, A., Woodman, O., Ritchie, R., & Qin, C., (2020).** Non-alcoholic steatohepatitis: a review of its mechanism, models and medical treatments. *Frontiers Pharmacology*; 11:603926.
- Petrescu, M., Vlaicu, S. I., Ciumărnean, L., Milaciu, M. V., Mărginean, C., Florea, M., & Popa, M. (2022).** Chronic inflammation-A link between nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and dysfunctional adipose tissue. *Medicina*; 58(5): 641.
- Pouwels, k. & Ramparain, D. (2022).** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. *BMC endocrine disorders*; 22(1): 1-63.
- Rama, T., Pratiksha, B., Navyasri, C., Kalita, D., & Alam, S. (2023).** Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*; 13(10): 149-153.
- Reitman, S., & Frankel, S. (1957).** Méthode colorimétrique pour la détermination des transaminase glutamique oxalacétique et glutamique pyruvique sériques. *American Journal of Clinical Pathology* ; 28(1):56-63.
- Rial, S. (2020).** Mise en évidence des propriétés préventives et curatives des lipides à chaînes moyennes contre l'obésité et la stéatose hépatique non alcoolique (Doctoral Dissertation, Université du Québec à Montréal).
- Rives, C., Fougerat, A., Ellero-Simatos, S., Loiseau, N., Guillou, H., Gamet-Payrastre, L., & Wahli, W. (2020).** Oxidative Stress in NAFLD : Role of Nutrients and Food Contaminants. *Biomolecules* ; 10(12), 1702.
- Rodriguez, R., Vauzour, D., & Minihane, A. (2016).** Polyphénols et stéatose hépatique non alcoolique : impact et mécanismes. *Actes of Nutrition Society* ; 75(1), 47–60.
- Roxane, St-A. (2020).** La stéatose hépatique et ses effets sur la régulation du métabolisme du cholestérol chez le rat École de kinésiologie et des sciences de l'activité physique, Faculté de Médecine, Université de Montréal.
- Sahu, J., Kirti, J., Bharti, J., & Ram, K. (2011).** A review on phytopharmacology and micropropagation of *Spilanthes acmella*. *Pharmacologyonline* ; 2: 1105-1110.
- Samar, H., Sara, A., Wahdan, D., Elsherbiny, E. (2020).** Diosmin ameliorates inflammation, insulin resistance, and fibrosis in an experimental model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 2020 (40): 115101.
- Sinha, A. (1972).** Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*; 47(2):389-394.

- Smith, A., & Bruton, J. (1977).** A colour atlas of histological staining techniques. (P. 192pp) Cabidigitallibrary.Org.
- Song, C., Long, X., He, J., and Huang, Y. (2023).** Recent evaluation about inflammatory mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease. *Frontiers Pharmacology*; 14:1081334.
- Syed, N., Asma, M., Muhammad, Z., Nauman, B., Muhammad, M., Faheem, A., & Khizar, A. (2018).** Hepatoprotective and hepatocurative effects of *Spilanthes acmella* Murr against paracetamol induced hepatotoxicity. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*; 31(5): 2061-2068.
- Takahashi, Y., Soejima, Y., & Fukusato, T. (2012).** Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/ nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*; 18(19): 2300-2308.
- Targher, G., Byrne, D., & Tilg, H. (2020).** Nafld and increased risk of cardiovascular disease: clinical associations, pathophysiological mechanisms and pharmacological implications. *Gut*; 69(9), 1691-1705.
- Tienoue, F., Ntentie, F., Mbong, M.-A., Edoun, L., Makamwe, I., Youovop, J., & Oben, E. (2023).** Sub-acute toxicity study of the aqueous extract from leaves and flowers of *Acmella caulirhiza* on female albino Wistar rats. *Toxicology and Environmental Health Sciences*; 15(3): 227-237.
- Tienoue, H. M., Mbong, M.-A., Ntentie, R., Nwang, F., Makamwe, I., Edoun, L., Zingue, S., & Oben, J. (2024).** Phytochemical characterization and assessment of antitumor activity of the aqueous extract of *Acmella caulirhiza* in female Wistar rats induced by 7, 12 dimethylbenz (a) anthracene. *Phytomedicine Plus*; 4(2), 100527.
- Tietz, N., White, W., Mosby, C., Louis, P., Young, D., & Henry, R. (1964).** Quantitative determination of chloride in serum/plasma. *Chemistry*; 10:533.
- Ullah, R., Rauf, N., Nabi, G., Ullah, H., Shen, Y., Zhou, Y., & Fu, J. (2019).** Rôle de la nutrition dans la pathogenèse et la prevention de la stéatose hépatique non alcoolique : mises à jour récentes. *Revue internationale des sciences biologiques* ; 15(2):265-276.
- Van De Wier, Bregje, Ger H. Koek, Aalt Bast, & Guido R. M. M. Haenen. (2017).** The Potential of Flavonoids in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 57 (4): 834-55.

- Wang, Y., Jian, L., Mon, H., Wen-Long, W., & Yun-Zhang, L. (2015).** Prevention and treatment effect of total flavonoids in *Stellera chamaejasme L.* on nonalcoholic fatty liver in rats. *Lipids In Health And Disease*; 14(85):1-9.
- Wan-Ju, Y., Jung, Ko., Wen-Chih, H., Wei-Yi, Ch., & Hsin-Yi, Y. (2020).** Crude extract of *Camellia oleifera* pomace ameliorates the progression of non-alcoholic fatty liver disease via decreasing fat accumulation, insulin resistance and inflammation. *British Journal of Nutrition*; 123: 508–515.
- Yagi, K. (1976).** A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemical Medicine*; 15(2):212-216.
- Yao, P., & Liu, Y. (2023).** Terpenoids: Natural Compounds for NonAlcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Therapy. *Molecules*; 28: 272.
- Youcef, N. (2015).** Inflammation métabolique et insulino-résistance: les connaissances actuelles. *Medecine des maladies métabolique*; 9 (3):279-291.
- Younossi, Z. (2017).** Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *Journal of Hepatology*; 70 (3) 531–544.
- Younossi, Z., Anstee, Q., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., & al. (2018).** Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *National Review Gastroenterologyl Hepatology*; 15(1):11-20.
- Zakaria, Z., Zaidatul, A., Victor, U., & Mahaneem, M., (2021).** The promising roles of medicinal plants and bioactive compounds on hepatic lipid metabolism in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in animal models: molecular target. *Archives of Physiology and Biochemistry*; 129(6) : 1262-1278.
- Zampaglione, L., Ferrari, J., & Goossens, N. (2020).** La stéatopathie dysmétabolique. *springermedizin.ch*
- Zandani, G., Anavi-Cohen, S., Yudelevich, T., Nyska, A., Dudai, N., Madar, Z., & Gorelick, J. (2022).** *Chiliadenus iphionoides* Reduces Body Weight and Improves Parameters Related to Hepatic Lipid and Glucose Metabolism in a High-Fat-Diet-Induced Mice Model of NAFLD. *Nutrients*; 14(21), 4552.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Dosage des paramètres lipidiques

➤ Dosage des triglycérides : kit *Labcare*

Méthode : Test enzymatique colorimétrique utilisant le glycérol-3-phosphate-oxydase

Réactifs

Réactif1 : Réactif Triglycérides

Standard triglycérides: 200mg/dl (2,25mmol/L)

Préparation des réactifs : les réactifs sont prêts à l'emploi

Stabilité et stockage du réactif : le réactif est stable jusqu'à la date de péremption lorsqu'il est conservé à 2-8°C. À conserver à l'abri de la lumière.

➤ Dosage Cholestérol Total : kit *Labcare*

Méthode : test enzymatique photométrique utilisant le CHOD-POD

Réactifs

Réactif1 : réactif Cholestérol

Triglycérides standard : 200mg/dl (2,25mmol/L)

Préparation des réactifs : les réactifs sont prêts à l'emploi

Stabilité et stockage du réactif : le réactif est stable jusqu'à la date de péremption lorsqu'il est conservé à 2-8°C. À conserver à l'abri de la lumière.

➤ Dosage HDL-cholestérol : kit *Liquicolor*

Composition des réactifs

Réactif R1 : Enzymes (capuchon blanc)

Tampon de Good, pH 6,6	100 mmol/L
------------------------	------------

Chlorure de sodium	170 mmol/L
--------------------	------------

Cholestérol estérase	1400 U/L
----------------------	----------

Cholestérol Oxydase	800 U/L
---------------------	---------

Catalase	600 kU/L
----------	----------

Oxydase d'ascorbate	3000 U/L
---------------------	----------

HDAOS	0,56 mmol/L
-------	-------------

Conservateur	0,1 % p/v
--------------	-----------

Reactif 2 : Substrat (capuchon vert)

Peroxydase	3500 U/L
4-amino antipyrine	4 mmol/L
Tampon de Good, pH 7,0	100 mmol/L

Calibrateur (capuchon noir)

Sérum humain, lyophilisé

Préparation des réactifs et stabilité

R1 et R2 sont prêts à l'emploi.

Préparation du Calibrateur : reconstituer le contenu du flacon avec exactement 5.0 ml d'eau distillée/déionisée, fermer le flacon et agiter soigneusement afin de dissoudre tout le lyophilisat. Avant utilisation, laisser reposer à température ambiante pendant au moins 30 minutes à l'abri de la lumière.

Annexe 2: Dosage du MDA

➤ **Préparation du réactif TBA (Acide thiobarbiturique)**

Pour 100mL de réactif :

- Acide trichloroacétique (TCA) 20% p/v (20g dans 100mL) ;
- Acide thiobarbiturique (TBA) 0,375% p/v (0,375g dans 100mL);
- HCl (1 N) ;
- Butylhydroxytoluène (BHT) 0,01% p/v (0,01g dans 100mL).

➤ **Préparation de la solution de TBA**

Trois cent soixante-quinze milligrammes (0,375 g) de TBA, 20 g de TCA, 0,01 g de BHT, 25 mL de HCl (1N) et 50 mL d'eau distillée ont été introduits dans un bécher. La solution obtenue a été chauffée à 40°C dans un bain-marie jusqu'à solubilisation complète du TBA, puis transférée dans une fiole de 100 mL. Le volume a été complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge

Annexe 3: Dosage du NO

➤ **Préparation de la solution de Dichlorure de N-1-Naphtyléthylène diamine et la solution de sulfanilamide**

- NED 0.1% (0,1g dans 100ml d'eau distillée) ;
- sulfanilamide 1% dans 5% d'acide phosphorique : 1g de sulfanilamide a été introduit dans 5,88mL d'acide phosphorique 5%. Le volume a été complété à 100ml avec de l'eau distillée.

Annexe 4: dosage des protéines totales (Gornall et al., 1949)

➤ Préparation du réactif de biuret

Solution A : 0,75g CuSO₄ (sulfate de cuivre penta-hydraté) + 3g de tartrate double NaK dissous dans 100mL dans l'eau distillée.

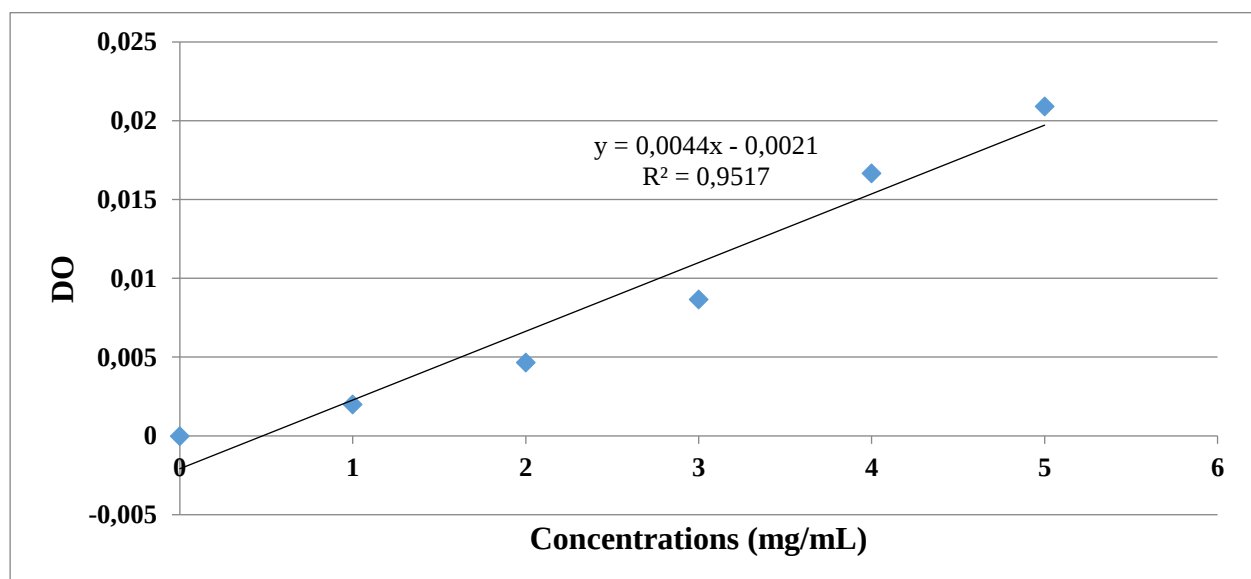
Solution B : NaOH (15g) dissout dans 100mL d'eau distillée.

Réactif de biuret : mélanger la solution A et B, compléter le volume à 500mL avec de l'eau distillée

➤ Tableau d'étalonnage pour la solution de BSA

Tubes tests	0	1	2	3	4	5	6
Standard BSA (ml)	-	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
NaCl 0,9%	0,1	0,09	0,08	0,06	0,04	0,02	-
[BSA]mg/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Réactif 1(ml)	1	1	1	1	1	1	1
Réactif 2 (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Annexe 5: Courbe d'étalonnage des protéines totales



Annexe 6: Dosage de la catalase

Réactifs :

- Peroxyde d'hydrogène (0,2M) ;
- Tampon phosphate (0,01M ; pH 7,0) ;
- Dichromate de Potassium (5%) ;

➤ Préparation du Tampon phosphate (0,01M ; pH 7,0)

0,0038g de phosphate disodique (Na_2HPO_4) et 0,0061g de phosphate monosodique (NaH_2PO_4) ont été dissouts et homogénéiser dans 80 mL d'eau distillée puis le pH a été ajusté avec du NaOH (0,4N ; m=5,6g).

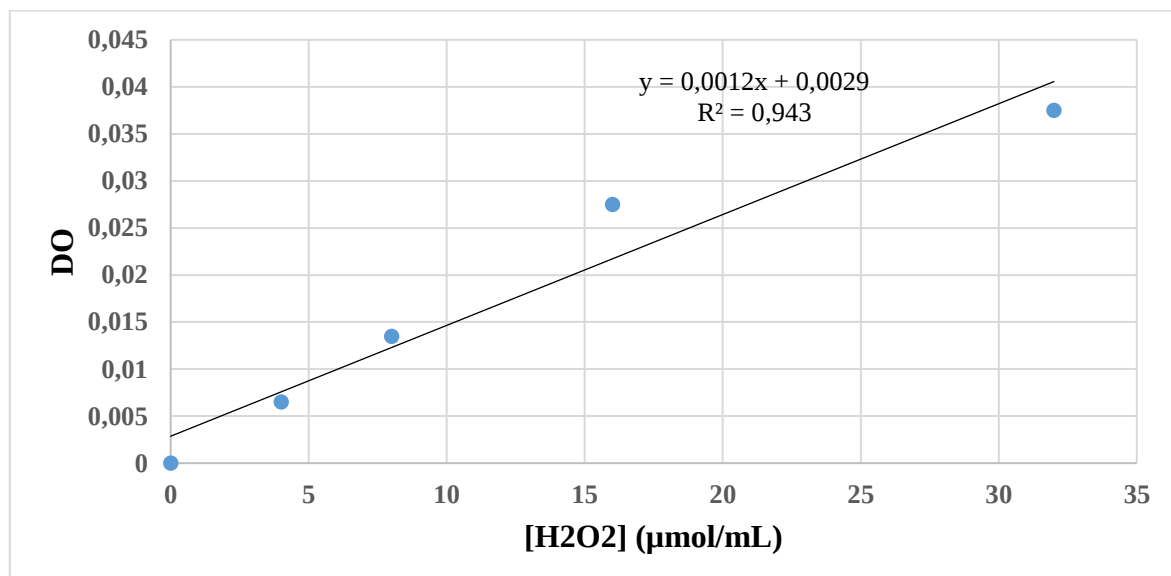
➤ Préparation de la solution de dichromate-acide acétique

100mL de dichromate de potassium a été mélangé à 300mL d'acide concentré (10mM)

➤ Tableau d'étalonnage de l'activité de la catalase

N° tubes	1	2	3	4
H ₂ O ₂ (μL)	0	20	40	80
H ₂ O (μL)	1000	980	960	920
Volume dichromate / acide acétique (mL)	1	1	1	1

Annexe 7: Courbe d'étalonnage Catalase



Annexe 8: Dosage des transaminases

➤ Préparation du Tampon phosphate (0,1M ; pH 7,4 ; vf 80mL)

1,08g de phosphate disodique (Na_2HPO_4) et 0,46g de phosphate monosodique (NaH_2PO_4) ont été dissouts et homogénéiser dans 80 mL d'eau distillée puis le pH a été ajusté avec du NaOH (0,4N ; m=5,6g).

➤ Dosage ALAT : préparation du substrat (Alanine 200mM + α cétooglutarate)

0,35g d'Alanine et 0,0058g d' α cétooglutarate ont été dissouts dans 4 mL de tampon phosphate puis le pH a été ajusté avec du NaOH. Le volume a été complété à 20mL avec du Tampon phosphate.

➤ Dosage ASAT : préparation du substrat (Aspartate + α cétooglutarate)

L'aspartate (0,53g) et l' α cétooglutarate (0,0058g) ont été dissouts dans 4mL de tampon phosphate puis le NaOH a été ajouté afin d'ajuster le pH. Le volume a été complété à 20mL avec du tampon phosphate.

➤ Réaction de coloration dans 40mL HCl (1N)

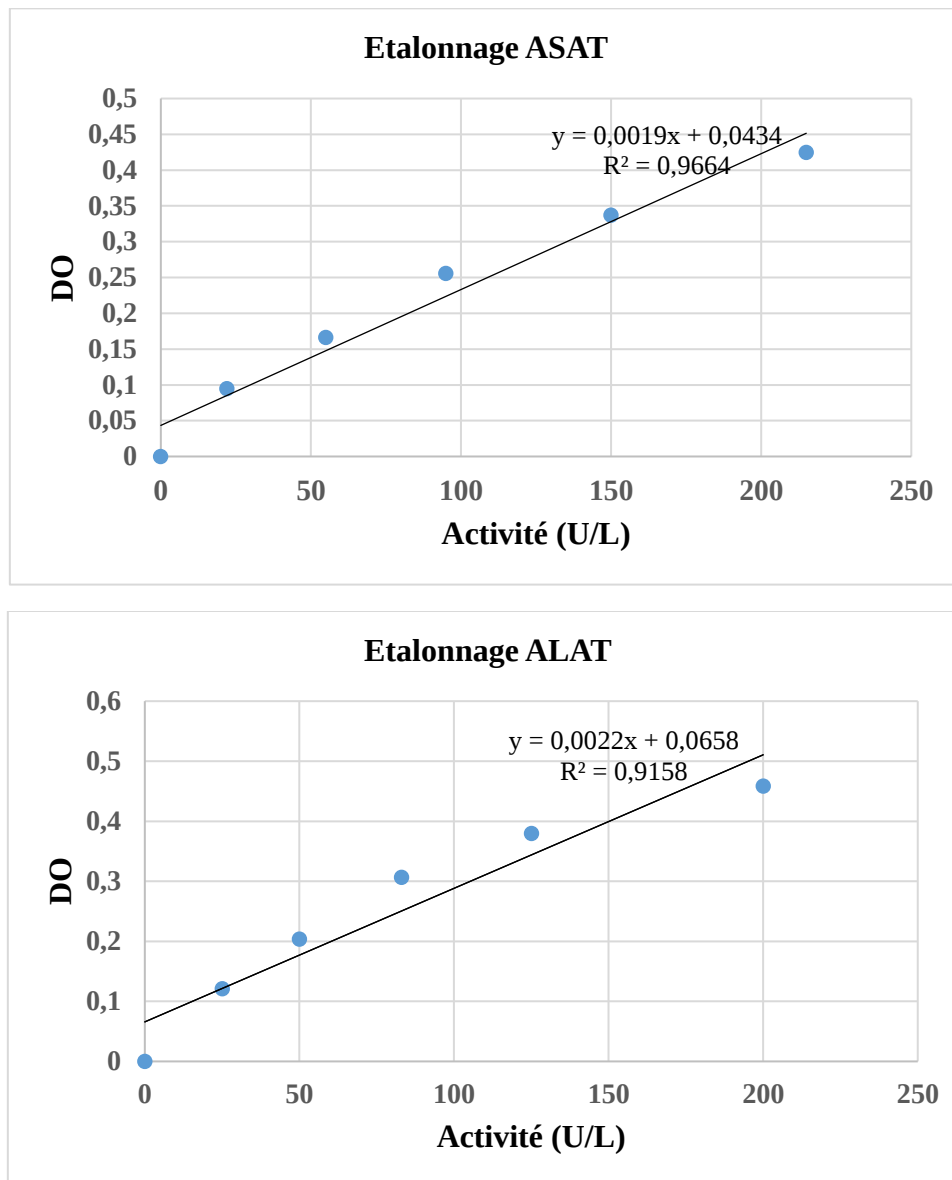
2,4 DNPH m= 0,0079g introduite dans une solution de HCl 1N

HCl 1N : $V_i = 3,33\text{mL HCl } 12\text{N} + 36,67\text{ mL d'eau distillée}$

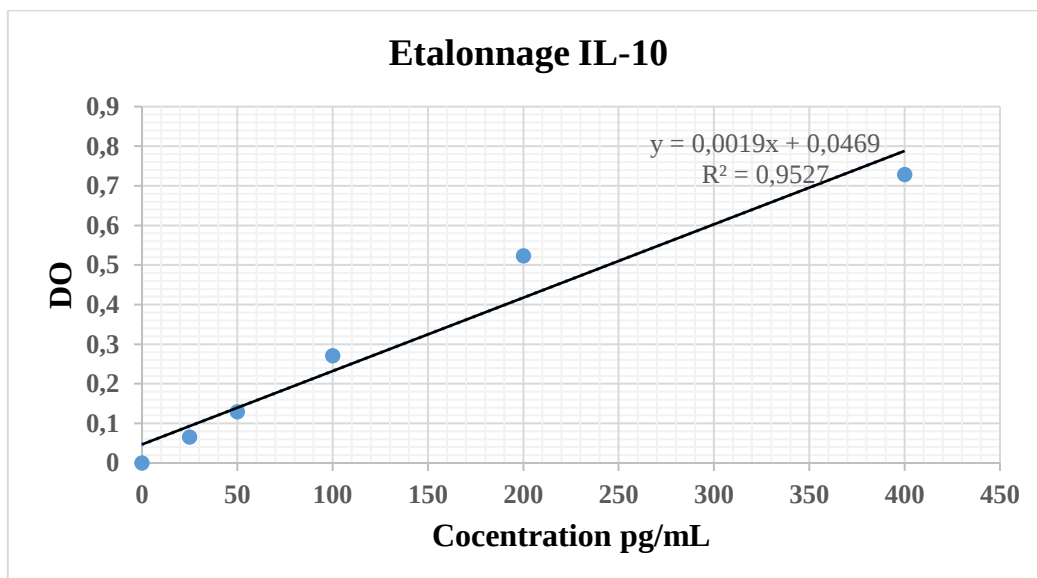
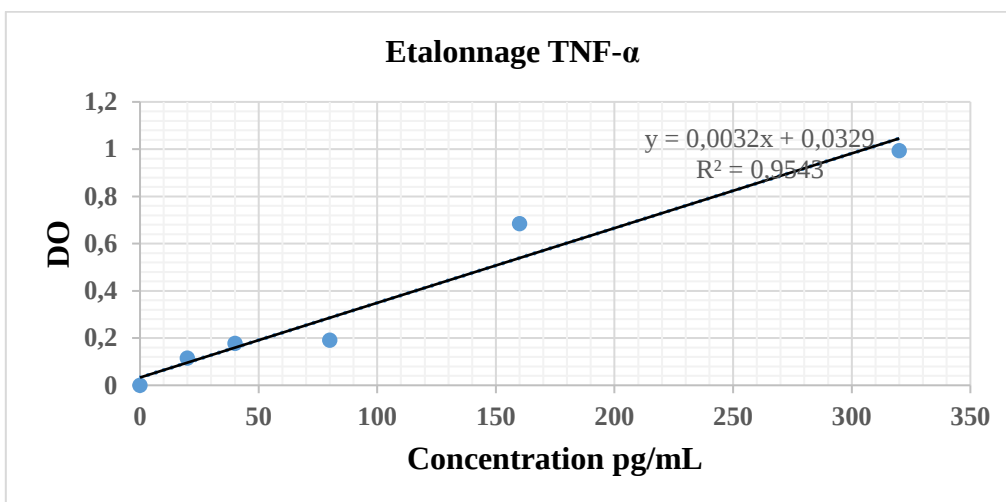
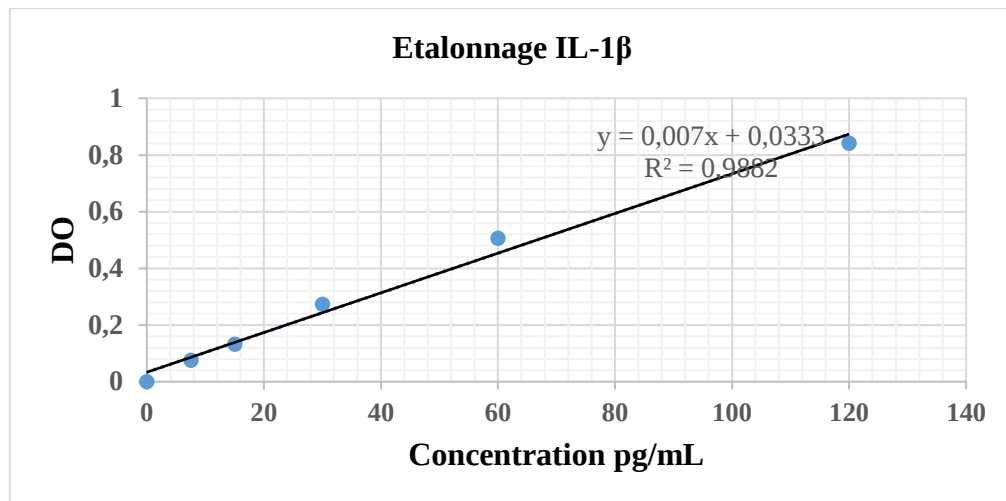
➤ Préparation des tubes pour l'étalonnage de l'activité des transaminases

Tubes	1	2	3	4	5	6
Eau distillée (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
SubstratALAT(mL)/ASAT(mL)	0,1	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05
Pyruvate de sodium (mL)	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
DNPH	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Incubation 20 minutes à température ambiante						
NaOH (mL)	1	1	1	1	1	1
Laisser à température ambiante pendant 5 minutes et lire la DO à 505 nm contre le blanc						
Activité correspondante						
GOT (unités d'ASAT/mL)/GPT (unites d'ALAT/mL)	0	50	100	150	200	250

Annexe 9: Courbe d'étalonnage de l'activité des transaminases



Annexe 10: Courbes d'étalonnage pour les marqueurs inflammatoires



Annexe 11: Dosage des marqueurs pro et anti-inflammatoires (Microelisa stripplate)

➤ Composition du kit

Eléments	Quantité
Standard	0,3mL*6tubes
Diluant d'échantillon	6,0mL
Réactif conjugué HRP	10,0mL
Solution de lavage 20X	25Ml
Solution chromogène A	6,0mL
Solution chromogène B	6,0mL
Solution d'arrêt	6,0mL
Membrane de la plaque de fermeture	2
Manuel d'utilisation	1
Sachets scellés	1

- **Préparation du réactif :** la solution de lavage a été diluée dans de l'eau distillée ou déionisée dans les proportions 1 :20

Annexe 12: Tableaux pour le mode opératoire des coupes

Tableau 4: Protocole d'une batterie de déparaffinage

Ordre	Solution	Temps de séjour	Ordre	Solution	Temps de séjour
1	Xylène	10 minutes	5	Ethanol 100°	3 minutes
2	Xylène	10 minutes	6	Ethanol 100°	3 minutes
3	Xylène	10 minutes	7	Eau distillée	10 minutes
4	Ethanol 100°	3 minutes			

Tableau 5: Étapes de la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

Ordre	Solution	Temps de séjour	Ordre	Solution	Temps de séjour
1	Hématoxyline de Mayer	10 minutes	7	Ethanol 100 %	1 minute
2	Rinçage à l'eau courante	10 minutes	8	Ethanol 100 %	1 minute
3	Carbonate de lithium 0,5 %	15 secondes	9	Xylène	5 minutes
4	Rinçage à l'eau distillée	5 minutes	10	Xylène	5 minutes
5	Eosine à l'alcool 0,5 %	5 minutes	11	Xylène	5 minutes
6	Ethanol 100 %	1 minute	12	Montage sous résine	

Annexe 12: Clairance éthique

Centre de Recherche et Formation Doctorale, Science de la Vie, Santé et Environnement (CRFD-SVSE)
Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environmental Sciences
University of Yaoundé I (UYI)



Joint Institutional Review Board for Animal & Human Bioethics (JIRB)
Email: jirbsecretariat@gmail.com

15 April 2024

WANMEGNE DJOUKOUO WOMBIWO Jordan
University of Yaoundé 1, Cameroon
Faculty of Science, Department of Biochemistry

Ethical Clearance Reference N°: BTC-JIRB2024-112 (please use this reference number for all correspondences)

Protocol Title: “ Effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Acmella caulirhiza* sur quelques marqueurs du système immunitaire et inflammatoire chez un modèle animal nutritionnel de la stéatose.”

Investigator(s) Name(s): WANMEGNE DJOUKOUO WOMBIWO Jordan, MSc Student, Pr. MBONG Angie Mary-Ann & Pr. Oben Julius, Supervisors.

The proposed research protocol and related documents have been reviewed and deliberated by the JIRB of the Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environment Sciences (CRFD-SVSE) at the Biotechnology Centre, University of Yaoundé 1, on the 23rd February 2024.

The JIRB is satisfied with the current version of the research protocol and supporting documents and agrees that there is no objection on ethical grounds to the proposed study. The JIRB is therefore pleased to approve it on the consideration that the research team will strictly abide by the conditions of the approval below:

- Investigators must strictly follow the plan of the approved protocol. Any changes to the approved protocol will require prior JIRB approval.
- Must be promptly reported to the JIRB: (1) Any deviations from or changes to the protocol that are made to eliminate immediate hazards to the fauna or study participants; (2) All risks that may be rare or remote and especially those that may entail serious consequences or compromise potential benefits or that would affect the conduct of the research.
- Must prepare and submit a standard progress report of the research to the JIRB at completion or one year from the date of issuance of the approval letter and thereafter, on an annual basis.
- Must notify the JIRB when the research is completed. Failure to submit an annual progress report on the study may affect the conditions of approval.

The current ethical clearance is for one-year renewable, on the condition that a progress report is submitted to the JIRB. While the JIRB has given its approval for this study on a satisfactory ethical basis, it is necessary for the investigators to obtain research permit from the Ministry of Scientific Research and Innovation (MINRESI, Cameroon).

Sincerely,

Professor Jude D. Bigoga, M.Sc, Ph.D.
JIRB Chair
Faculty of Science, University of
Yaoundé I, Cameroon



**Professor Frederic Nico Njayou, M.Sc.,
Ph.D.**
Coordinator for Animal Research Bioethics
Faculty of Science, University of Yaoundé
I, Cameroon