

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF
BIOCHEMISTRY

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

CENTRE FOR RESEARCH AND
TRAINING
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE,
HEALTH
AND ENVIRONMENTAL
SCIENCES
LABORATORY OF
PHARMACOLOGY AND
TOXICOLOGY

**Mécanismes moléculaires des propriétés anti-
hépatotoxiques et antivirales (virus de l'hépatite C)
des composés actifs isolés de *Khaya grandifoliola*
C.DC (Meliaceae)**

THESE

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du Doctorat/Ph.D en
Biochimie

Par : **KOUAM FONDJO Arnaud**
Master en Biochimie

Sous la direction de
MOUNDIPA FEWOU Paul
Professeur Université de Yaoundé I
NJAYOU Frédéric Nico
Maître de Conférences Université de Yaoundé I

Année Académique : 2017 - 2018



REPUBLIQUE DU CAMERON
Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE
B.P. 812 Yaoundé, Cameroun



REPUBLIC OF CAMEROON
Peace-Work-Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
P.O.Box 812, Yaoundé, Cameroon

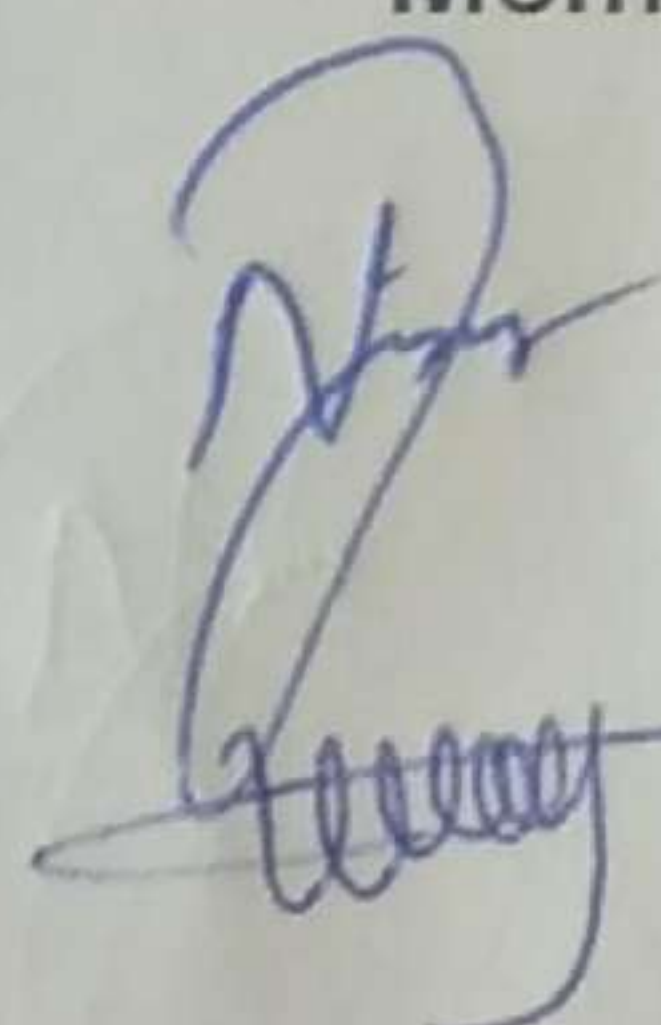
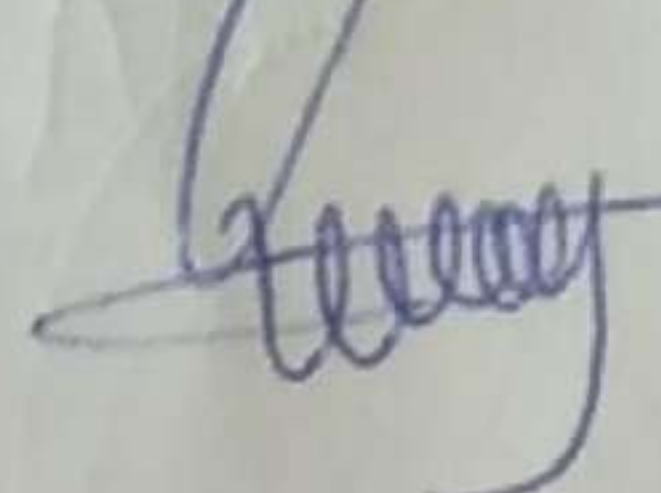
Yaoundé, le **20 JUIN 2018**

ATTESTATION DE CORRECTION

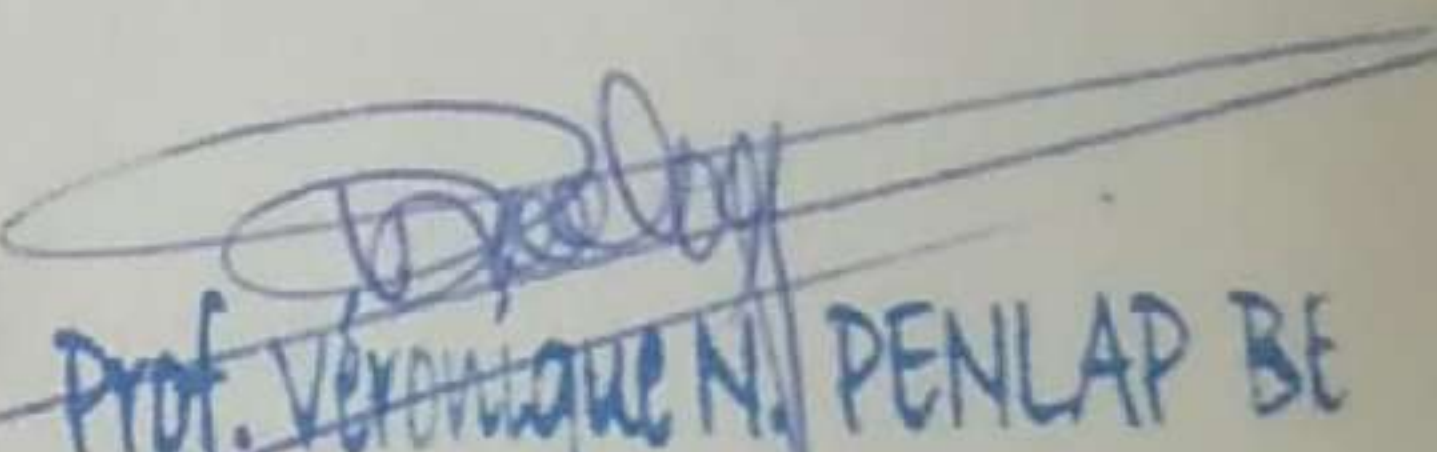
Nous soussignés, membres du Jury de la soutenance de thèse de Doctorat/PhD en Biochimie intitulée « Mécanismes moléculaires des propriétés anti-hépatotoxiques et antivirales (virus de l'hépatite C) des composés actifs isolés de *Khaya grandifoliola* C.DC (Meliaceae) » de M. KOUAM FONDJO Arnaud, matricule : 07R407, attestons que ce candidat a effectué les corrections exigées lors de cette évaluation faite en date du 25 Mai 2018.

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

Membres du Jury

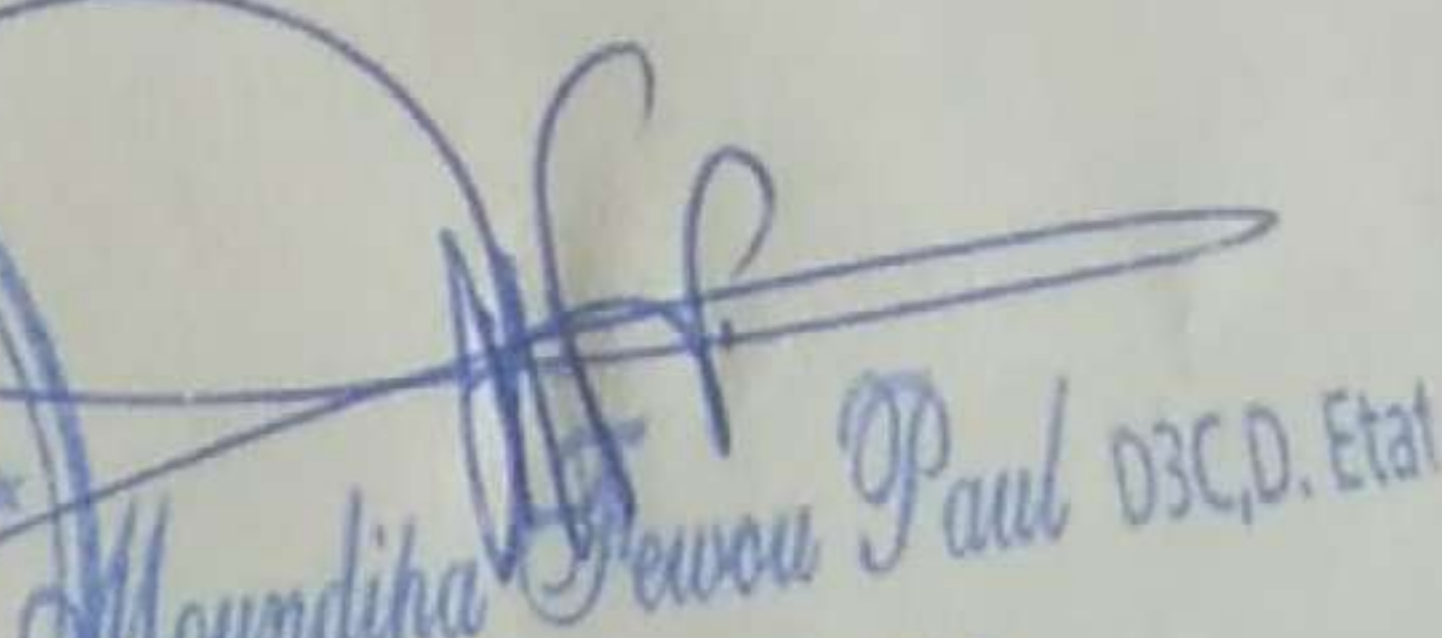
 N. Njoum-R
 N. Kenfou N. Céline

Président du Jury


Prof. Véronique N. PENLAP BE
Professor
Head of the LTR Laboratory (BTCUYI)

Le Chef de Département de Biochimie




Moundipa Devou Paul D3C,D. Etat
Professor
Enzymology-Toxicology

**LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I
ANNEE ACADEMIQUE 2017/2018
(Par Département et par Grade)**

ADMINISTRATION

DOYEN : AWONO ONANA Charles, Professeur

VICE-DOYEN / DPSAA : DONGO Etienne, Professeur

VICE-DOYEN / DSSE : OBEN Julius ENYONG, Professeur

VICE-DOYEN / DRC : MBAZE MEVA'A Luc Léonard, Maître de Conférences

Chef Division Affaires Académiques, Scolarité et Recherche : ABOSSOLLO Monique,
Chargée de Cours

Chef Division Administrative et Financière : BELINGA née NDOYE FOE Marie C. Florentine,
Maître de Conférences

1- DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (40)			
N°	NOMS ET PRENOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BENG née NINTCHOM PENLAP V.	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	MBACHAM Wilfried	Professeur	En poste
4	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
5	OBEN Julius ENYONG	Professeur	<i>Coordonnateur CRFD-STG et Vice-Doyen/DSSE</i>
6	BIGOGA DIAGA Jude	Maître de Conférences	En poste
7	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
8	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
9	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
10	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
11	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste

12	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
13	WAKAM née NANA Louise	Maître de Conférences	En poste
14	BELINGA née NDOYE FOE Marie C. Florentine	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
15	ACHU Merci BIH	Chargé de Cours	En poste
16	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
17	ATOGHO Barbara Mma	Chargé de Cours	En poste
18	DEMMANO Gustave	Chargé de Cours	En poste
19	DJOKAM TAMO Rosine	Chargé de Cours	En poste
20	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Chargé de Cours	En poste
21	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
22	EFFA ONOMO Pierre	Chargé de Cours	En poste
23	EVEHE BEBANDOUÉ Marie –Solange	Chargé de Cours	<i>En disponibilité</i>
24	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
25	KOTUE TAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
26	LUNGA Paul KAILAH	Chargé de Cours	En poste
27	MBONG ANGIE MOUGANDE Mary Ann	Chargé de Cours	En poste
28	MOFOR née TEUGWA Clautilde	Chargé de Cours	<i>IA4/MINESUP</i>
29	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
30	PECHANGOÛ NSANGOÛ Sylvain	Chargé de Cours	En poste
31	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste
32	AZANTSA Boris	Chargé de Cours	En poste
33	BEBEE FADIMATOU	Assistant	En poste
34	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Assistant	En poste
35	DAKOLE DABOY Charles	Assistant	En poste
36	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Assistant	En poste
37	FONKOUA Martin	Assistant	En poste
38	MANANGA Marlyse Joséphine	Assistant	En poste

39	MBOUCHE FANMOE Marcelline Joëlle	Assistant	En poste
40	TIENTCHEU DJOKAM Léopold	Assistant	En poste
2- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (B.P.A.) (44)			
1	BILONG BILONG Charles Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
4	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
5	MIMPFOUNDI REMY	Professeur	En poste
6	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
7	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
8	NOLA Moïse	Professeur	En poste
9	TAN Paul Vernyuy	Professeur	En poste
10	TCHUEM TCHUENTE Louis	Professeur	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
11	AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM	Maître de Conférences	En poste
12	DJIETO Lordon Champlain	Maître de Conférences	En poste
13	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
14	ESSOMBA née NTSAMA MBALLA	Maître de Conférences	<i>VDRC/Chef dépt FMSB</i>
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	<i>CT2 MIN. ENERGIE</i>
16	KAMGANG René	Maître de Conférences	<i>C.E. MINRESI</i>
17	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
18	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
19	MONY NTONE Ruth	Maître de Conférences	En poste
20	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste
20	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	En poste
21	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
22	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
23	BILANDA Danielle Claude	Chargé de Cours	En poste

24	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
25	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
26	JATSA MEGAPTCHE Hermine	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
27	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
28	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
29	MOUGANG NGAMENI Luciane	Chargé de Cours	En poste
30	LEKEUFACK FOLEFACK Guy Benoît	Chargé de Cours	En poste
31	NGOULATEU KENFACK Omer BEBE	Chargé de Cours	En poste
32	NGUEGUIM TSOFACK Florence	Chargé de Cours	En poste
33	NGUEMBOCK	Chargé de Cours	En poste
34	NJUA Clarisse YAFI	Chargé de Cours	En poste
35	TADU Zéphirin	Chargé de Cours	En poste
36	TOMBI Jeannette	Chargé de Cours	En poste
37	YEDE	Chargé de Cours	En poste
38	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
39	KANDEDA KAVAYE Antoine	Assistant	En poste
40	KOGA MANG'Dobara	Assistant	En poste
41	METCHI DONGFACK Mireille Flore	Assistant	En poste
40	NOAH E. O. Vivien	Assistant	En poste
41	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Assistant	En poste

3-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES (B. P. V.) (27)

1	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
2	AMBANG Zachée	Professeur	Vice-Doyen/FSE
3	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
4	BELL Joseph Martin	Maître de Conférences	En poste
5	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
6	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste

7	MBOLO Marie.	Maître de Conférences	En poste
8	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
9	ZAPFACK Louis	Maître de Conférences	En poste
10	ANGONI Hyacinthe	Chargé de Cours	En poste
11	BIYE Elvire Hortense	Chargé de Cours	En poste
12	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Chargé de Cours	En poste
13	MALLA Armand William	Chargé de Cours	En poste
14	MBARGA BINDZI Marie Alain.	Chargé de Cours	<i>Inspecteur académ. N°1 MINESUP</i>
15	NGALLE Hermine BILLE	Chargé de Cours	<i>Coordo. Programme MINFOF</i>
16	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Chargé de Cours	En poste
17	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy Léonard	Chargé de Cours	En poste
18	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
19	NSOM ZAMO Annie Claude ép. Pial	Chargé de Cours	<i>Expert national./UNESCO</i>
20	ONANA Jean Michel	Chargé de Cours	En poste
21	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
22	TSOATA Esaïe	Chargé de Cours	En poste
23	DJEUANI Astride Carole	Assistant	En poste
24	GONMADGE Christelle	Assistant	En poste
25	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Assistant	En poste
26	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistant	En poste
27	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Assistant	En poste

4-DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (C.I.) (35)

1	KETCHA MBADCAM Joseph	Professeur	Chef de Département
2	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
3	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen/ UDS</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Directeur Cabinet PM</i>
5	LAMINSI Samuel	Professeur	En poste

6	MELO née CHINJE Uphie F.	Professeur	<i>Recteur/UN</i>
7	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Insp Génér.MINPMEA</i>
8	NANSEU Charles Péguy	Professeur	En poste
9	NENWA Justin	Professeur	En poste
10	BABALE DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	En poste
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	ELIMBI Antoine	Maître de Conférences	En poste
13	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
14	NDIKONTAR Maurice KOR	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen/Ubda</i>
15	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>Recteur/UBuea</i>
16	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
17	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
18	CHEUMANI YONA Arnaud	Chargé de Cours	En poste
19	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
20	GWET Simon – Pierre	Chargé de Cours	En poste
21	KAMGANG YOUNBI Georges	Chargé de Cours	En poste
22	KEUMEGNE MBOUGUEM Jean Claude	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO Gustave	Chargé de Cours	. En poste
24	MBEY Jean Aimé	Chargé de Cours	En poste
25	NDI Julius NSAMI	Chargé de Cours	En poste
26	NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargé de Cours	En poste
27	NJIOMOU Chantale épouse DJANGANG	Chargé de Cours	En poste
28	NJOYA Dayirou	Chargé de Cours	En poste
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE Awaou	Chargé de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Assistant	En poste
33	KOUOTOU DAOUDA	Assistant	En poste

34	MAKON Thomas Beauregar	Assistant	En poste
35	NCHIMI NONO Katia	Assistant	En poste
5-DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (C.O.) (33)			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/ DSSE
2	GHOGOMU TIH ROBERT RALPH	Professeur	<i>Directeur I.B.A. Fouban</i>
3	MBAFOR Joseph	Professeur	En poste
4	NGADJUI TCHALEU B.	Professeur	<i>Chef de dépt FMBS</i>
5	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de dépt. UDs</i>
6	NKENGFACK Augustin Ephraïm	Professeur	Chef de Département
7	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Vice- Recteur UBda</i>
8	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur au MINESUP</i>
9	WANDJI Jean	Professeur	En poste
10	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>CS Rectorat/ UYI</i>
11	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
15	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
16	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>C.T. UYII</i>
17	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
18	TCHUENDEM KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
19	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
20	AMBASSA Pantaleon	Chargé de Cours	En poste
21	EYONG Kenneth OBEN	Chargé de Cours	En poste
22	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
23	KAMTO Eutrophe Ledoux	Chargé de Cours	En poste
24	MKOUNGA Pierre	Chargé de Cours	En poste

25	NGO MBING Joséphine	Chargé de Cours	En poste
26	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	En poste
27	NOTE LOUGBOT Olivier	Chargé de Cours	En poste
28	OUAHOUE WACHE Blandine Marlyse	Chargé de Cours	En poste
29	TABOPDA KUATE Turibio	Chargé de Cours	En poste
30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDEGOUNBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
32	NGINTEDO Dominique	Assistant	En poste
33	NGOMO Orléans	Assistant	En poste

6-DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (30)

1	TCHUENTE Maurice	Professeur	PCA UB
2	FOTSO Pauline Laure	Professeur	<i>Député à l'Assemblée Nationale</i>
3	FOUDA NDJODO Marcel	Professeur	<i>IGA-MINESUP/Chef Dpt ENS</i>
4	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	Chef de Département <i>Chef Division MINFOPRA</i>
5	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
6	CHEDOM FOTSO Donatien	Chargé de Cours	En poste
7	DJAM Xaviera Youth KIMBI	Chargé de Cours	En poste
8	KOUOKAM KOUOKAM Etienne Appolin	Chargé de Cours	En poste
9	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
10	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
11	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
12	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
13	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
14	ABESSOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
15	AMINOUE Halilou	Assistant	En poste
16	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste

17	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
18	EBELE Serge	Assistant	En poste
19	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
20	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistant	En poste
21	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
22	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
23	MAKEMBE S. Fritz Oswald	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistant	En poste
25	MONTHE DJIADEU Valery Martial	Assistant	En poste
26	NKONDOCK MI BAHANACK Nicolas	Assistant	En poste
27	OLE OLE David Claude	Assistant	En poste
28	TAPAMO KENFACK Hyppolite	Assistant	En poste

7-DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUES (MA) (33)

1	BEKOLLE David	Professeur	<i>Vice-Recteur UN</i>
2	BITJONG NDOMBOL	Professeur	<i>DAAC UY I</i>
3	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
4	AYISSI Raoul Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
5	EMVUDU WONO Yves S.	Maître de Conférences	<i>Chef Division MINESUP</i>
6	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
7	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
8	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	En poste
9	BOGSO Antoine M	Chargé de Cours	En poste
10	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
11	DOUANLA YONTA Hermann	Chargé de Cours	En poste
12	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
13	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
14	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste

15	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
16	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
17	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
18	MBELE BEDIMA Martin	Chargé de Cours	En poste
19	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
20	NGUEFACK Bertrand	Chargé de Cours	En poste
21	NGUIMTSA Charles	Chargé de Cours	En poste
22	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
23	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
24	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
25	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
26	TIAYA TSAGUE N. Anne- Marie	Chargé de Cours	En poste
27	DJIADEU NGAHA Michel	Assistant	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29	NIMPA PEFOUKEU Romain	Assistant	En poste
30	TANG AHANDA Barnabé	Assistant	<i>Chef Serv. MINPLAMAT</i>
31	TETSADJIO TCHILEPECK Mesmin Erick	Assistant	En poste

8-DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MB) (13)

1	ETOA François-Xavier	Professeur	Recteur UD/ Chef de Département
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En Poste
3	ESSIA NGANG Jean Justin	Maître de Conférences	<i>Chef de Division recherche IMPM</i>
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	ENO Anna Arey	Chargé de Cours	En poste

10	ESSONO OBOUGOU Germain Gabriel	Chargé de Cours	En poste
11	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Assistant	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Assistant	En poste
9-DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (41)			
1	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
2	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
3	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
4	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen/Ubda</i>
5	WOAFO Paul	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
8	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
9	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>Dir.Gén. B. MEKIM</i>
10	BEN- BOLIE Germain Hubert	Maître de Conférences	En poste
11	DJUIDJE KENMOE Gemaine épouse ALOYEM KAZE	Maître de Conférences	En poste
12	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Dépt UN</i>
13	EYEBE FOU DA Jean Sire	Maître de Conférences	En poste
14	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
15	MBANE BIOUELE	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
16	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
17	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. MINRESI</i>
18	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
19	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
20	SAIDOU	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
21	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste

22	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
23	BODO Bernard	Chargé de Cours	En poste
24	ENYEGUE A NYAM Françoise épouse BELINGA	Chargé de Cours	En poste
25	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
26	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	En Poste
27	HONA Jacques	Chargé de Cours	En poste
28	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En Poste
29	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
30	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
31	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	<i>Dir.acad/Univ.Int.Etat Cam-Congo</i>
32	SIMO Elie	Chargé de Cours	En poste
33	TABI Conrad Bertrand	Chargé de Cours	En poste
34	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
35	VONDOU DERBETINI Appolinaire	Chargé de Cours	En Poste
36	WAKATA née BEYA Annie	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. MINESUP</i>
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
38	ABDOURAHIMI	Assistant	En Poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En Poste
40	MELI'I Jorelle Larissa	Assistant	En Poste
41	MVOGO Alain	Assistant	En Poste

10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (S.T.) (44)

1	BILONG PAUL	Professeur	En poste
2	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
3	BITOM Dieudonné Lucien	Professeur	<i>Doyen / UN</i>
4	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	CSMM/ Chef de Département
5	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
6	KAMGANG Pierre	Maître de Conférences	En poste

7	MEDJO EKO Robert	Maître de Conférences	<i>Dir/IUT Bois Mbalmayo</i>
8	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINMIDT</i>
9	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
10	NGOS III Simon	Maître de Conférences	<i>D.A.A.C./UM</i>
11	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
12	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
13	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
14	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Cellule MINTP</i>
15	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Chargé de Cours	Chef DAASR
16	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	<i>Barage Memve'ele</i>
17	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Directeur Projet Barage Memve'ele</i>
18	EKOMANE Emile	Chargé de Cours	<i>Délégué Régional/MINMIDT</i>
19	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
20	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
21	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
22	GANNO Sylvestre	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
23	GHOGOMU Richard TANWI	Chargé de Cours	<i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i>
24	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
25	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>CS/LABOGENIE</i>
26	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i>
27	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
28	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
29	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
30	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	CEA MINRESI
31	NJOM Bernard de Lattre	Chargé de Cours	En poste
32	NYECK Bruno	Chargé de Cours	En poste
33	ONANA Vincent	Chargé de Cours	En poste
34	TCHAKOUNTE Jacqueline ép. NUMBEM	Chargé de cours	<i>CEA MINRESI</i>
35	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Chargé de Cours	En poste

36	ZO'O ZAME Philémon	Chargé de Cours	S.G. MINTP
37	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
38	ANABA ONANA Achille Basile	Assistant	En Poste
39	BINELI BETSI Thierry Olivier	Assistant	En Poste
40	METANG Victor	Assistant	En poste
41	NOMO NEGUE Emmanuel	Assistant	En poste
42	SABABA Elisé	Assistant	En Poste
43	TCHAPTCHET TCHATO De Pesquidoux I	Assistant	En poste
44	TEHNA Nathanaël	Assistant	CS/ MINMIDT

**Répartition chiffrée des enseignants permanents par Département
(31 Janvier 2017)**

Département	Nombre d'enseignants				
	Pr	MC	CC	ASS	Total
BC	5 (1)	8 (3)	16 (9)	14 (6)	40 (19)
BPA	10 (0)	9 (1)	14 (6)	11 (4)	44 (11)
BPV	1 (0)	7 (0)	12 (3)	7 (6)	27 (9)
C.I.	6 (1)	8 (0)	14 (3)	7 (2)	35 (6)
C.O.	9 (0)	10 (3)	12 (3)	2 (0)	33 (6)
IN	3 (1)	2 (0)	7 (0)	18 (4)	30 (5)
MA	3 (0)	6 (0)	17 (1)	7 (0)	33 (1)
MB	1 (0)	4 (1)	6 (2)	2 (0)	13 (3)
PH	8 (0)	10 (1)	18 (2)	5 (2)	41 (4)
ST	4 (0)	10 (1)	20 (4)	10 (0)	44 (5)
Total	50 (3)	73 (11)	136 (33)	83 (24)	340 (70)

Soit un total de : 340 (70) dont

- Professeurs 50 (3)
- Maîtres de Conférences 73 (10)
- Chargés de Cours 136 (33)
- Assistants 83 (24)

- () = Nombre de femmes.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

DEDICACE

Je dédie ce travail à:

➤ *mes parents: M. Fondjo Joseph et Mme Mamguia Bernadette*

➤ *mes frères et sœurs*

REMERCIEMENTS

A l'issue de ce travail, je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance:

- ☞ Au **Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul**, mon directeur de thèse, Chef de Département de Biochimie et Chef du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de l'Université de Yaoundé I. Vous m'avez accueilli dans votre équipe de recherche depuis 2011. Merci pour toute la formation scientifique reçue tout au long de ces années. Malgré vos lourdes responsabilités, vous avez œuvré sans relâche pour l'accomplissement de ce travail. Recevez ici Monsieur, l'expression de mes sincères remerciements.
- ☞ Au **Pr. NJAYOU Frédéric Nico**, mon co-directeur de thèse. En me faisant confiance sur ce sujet de thèse, vous m'avez donné la possibilité de développer de nombreuses collaborations et d'étendre mes capacités en recherche. Votre vision, votre esprit critique et votre rigueur ont été déterminants pour l'aboutissement de ce travail. Monsieur, soyez rassuré de ma profonde gratitude.
- ☞ Au **Pr. George Fu Gao** de l'*Institute of Microbiology, University of Chinese Academy of Sciences* à Pékin en Chine qui m'a accueilli dans son Laboratoire pour la réalisation de la majeure partie de ce travail.
- ☞ Aux **Pr. Fei Yuan et Pr. Fuhang Song** ainsi que **tous les membres** du *Cas Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology de l'Institute of Microbiology*, pour l'encadrement et les conseils reçus durant mon séjour à Pékin.
- ☞ Au **Pr. MKOUNGA Pierre** du Laboratoire de Substances Naturelles et de Synthèses Organiques de l'Université de Yaoundé 1 pour l'assistance et le matériel mis à ma disposition au cours de la réalisation d'une partie de ce travail.
- ☞ A **tous les Enseignants** au Département de Biochimie pour la formation académique reçue.
- ☞ A **tous les membres** du Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie pour les multiples conseils à moi prodigués pendant la réalisation de ce travail et lors des séminaires de laboratoire.
- ☞ A **toutes les personnes** qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail et dont les noms n'ont pas été cités. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

ORGANISMES DE FINANCEMENT

Je remercie:



→ L'*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology* (ICGEB), pour la bourse d'étude de 12 mois (N° S/CMR 15-06) qu'elle m'a octroyée dans le cadre du programme *The Arturo Falaschi Fellowship Programme*.



INSTITUTE OF MICROBIOLOGY
CHINESE ACADEMY OF SCIENCES

→ Le *Cas Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology* de l'*Institute of Microbiology* qui a bien voulu supporter les coûts liés à l'hébergement et aux manipulations lors de mon séjour en Chine.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTÉ DES SCIENCES.....	i
DEDICACE.....	xv
REMERCIEMENTS	xvi
ORGANISMES DE FINANCEMENT	xvii
TABLE DES MATIERES.....	xviii
LISTE DES ABREVIATIONS	xxiv
LISTE DES TABLEAUX	xxvi
LISTE DES FIGURES	xxvii
RESUME.....	xxx
ABSTRACT	xxxix
INTRODUCTION GENERALE	
1. Introduction	1
2. Hypothèse de recherche.....	4
3. Objectifs	4
3.1. Objectif général	4
3.2 Objectifs spécifiques	4
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	
I.1. Généralités sur le foie (Marrieb, 1999)	5
I.1.1. Anatomie et vascularisation du foie.....	5
I.1.2. Histologie du foie.....	6
I.1.2.1. Les hépatocytes	7
I.1.2.2. Les cellules sinusoidales	7
I.1.3 Fonctions du foie.....	8
I.2. Les maladies du foie	8
I.2.1. Les hépatites toxiques	8
I.2.1.1. Mécanisme moléculaire de l'hépatotoxicité induite par le paracétamol	9
I.2.1.2. Mécanisme moléculaire de l'hépatotoxicité induite par le cisplatine	11

I.2.1.3. Mécanisme moléculaire de l'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone	11
I.2.1.4. Systèmes de protection des hépatocytes contre les toxiques.....	12
I.2.1.5. Focus sur quelques facteurs moléculaires régulant les hépatites toxiques	15
I.2.2. Les hépatites virales: cas particulier de l'hépatite virale C (HVC).....	18
I.2.2.1. Description du virus de l'hépatite C (VHC)	18
I.2.2.2. Prévalence et variabilité génétique du VHC	18
I.2.2.3. Organisation génomique et protéines virales	20
I.2.2.4. Cycle de vie ou cycle infectieux du VHC.....	22
I.2.2.4.1. Protéines virales et hôtes impliquées dans le processus d'entrée.....	24
I.2.2.4.2. Protéines virales et hôtes impliquées dans le processus de traduction et réplication de l'ARN génomique	25
I.2.2.4.3. Protéines virales et hôtes impliquées dans le processus de d'assemblage et sécrétion des particules virales.....	27
I.3. Méthodes expérimentales d'étude des hépatites	28
1.3.1. Modèles expérimentaux d'étude des hépatites toxiques.....	28
1.3.1.1. Induction de l'hépatite toxique <i>in vivo</i>	28
1.3.1.2. Induction d'hépatite toxique <i>in vitro</i>	29
1.3.2. Modèles expérimentaux d'étude du VHC	31
1.3.2.1. Modèles d'étude du VHC <i>in vitro</i>	31
1.3.2.2. Modèles d'étude du VHC <i>in vivo</i>	36
I.4. Thérapies contre les hépatites	37
I.4.1. Approche moderne.....	37
I.4.1.1. Traitement des hépatites toxiques	37
I.4.1.2. Traitement de l'hépatite virale C.....	37
I.4.1.2.1. De l'interféron alpha à la bithérapie standard	38
I.4.1.2.2. Utilisation des agents antiviraux à action directes (DAAs)	40
I.4.2. Plantes médicinales et hépatites	41
I.4.2.1. Plantes médicinales et hépatites toxiques.....	41

I.4.2.2. Activités anti-VHC des extraits de plantes et de leurs métabolites secondaires	41
I.5. Présentation de la plante médicinale investiguée et des travaux antérieurs	45
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	
II.1. Matériel.....	48
II.1.1. Matériel végétal	48
II.1.2. Lignées cellulaires	48
II.1.2.1. Les cellules L-02.....	48
II.1.2.2. Les cellules Huh7.5	48
II.1.2.3. La bactérie <i>Escherichia coli</i> DH5 alpha	49
II.1.2.4. Les particules virales VHCcc ou virus infectieux produits en culture cellulaire.....	49
II.1.3. Réactifs et appareils.....	50
II.1.3.1. Réactifs	50
II.1.3.2. Appareils.....	51
II.2. Méthodes.....	52
II.2.1 Préparation de l'extrait brut, des fractions et sous-fractions de <i>K. grandifoliola</i>	52
II.2.2 Analyse des sous-fractions actives par chromatographie liquide de haute pression (HPLC) et purification des composés	54
II.2.3 Caractérisation des composés purifiés par spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) et par résonance magnétique nucléaire (RMN).....	55
II.2.3 Culture cellulaire et test de viabilité	55
II.2.4. Evaluation de l'effet des sous-fractions et composés de KgF25 contre l'hépatotoxicité induite par le cisplatine, l'acétaminophène ou le tétrachlorure de carbone.....	58
II.2.4.1. Préparation des différentes substances toxiques, des sous-fractions et composés de KgF25 et des composés hépato-protecteurs de référence.....	58
II.2.4.2. Traitement des cellules: procédure générale.....	59
II.2.4.3. Détermination de l'effet des sous-fractions et composés isolés de KgF25 sur la viabilité des hépatocytes L-02	59
II.2.4.4. Recherche de la concentration létale 50 (CL ₅₀) des toxiques à utiliser.....	63
II.2.4.5. Criblage de l'activité anti-hépatotoxique des sous-fractions de KgF25 et étude concentration-réponse des sous-fractions actives et des composés isolés.....	63

II.2.4.6. Etude des propriétés anti-hépatotoxiques des composés isolés	64
II.2.4.6.1. Test de viabilité cellulaire à l'iodure de propidium/4',6'-diamino-2- phénylindole	64
II.2.4.6.2. Evaluation de la production intracellulaire des espèces oxygénées réactives.....	65
II.2.4.6.3. Evaluation de la peroxydation lipidique membranaire	67
II.2.4.6.4. Dosage du glutathion cellulaire	68
II.2.4.7. Analyse des mécanismes moléculaires anti-hépatotoxiques des composés actifs isolés de KgF25.....	69
II.2.4.7.1. Analyse de l'expression des protéines par <i>Western Blot</i>	70
II.2.4.7.1.1. Définition.....	70
II.2.4.7.1.2. Traitement des cellules, extraction des protéines et fractionnement subcellulaire	71
II.2.4.7.1.3. Dosage des protéines	73
II.2.4.7.1.4. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE).....	75
II.2.4.7.1.5. Transfert et détection des protéines sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'anticorps	78
II.2.4.7.2. Analyse quantitative de l'expression des gènes des enzymes antioxydants par <i>quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction</i> (qRT-PCR).....	80
II.2.5. Evaluation <i>in vitro</i> de l'effet des composés isolés de KgF25 sur les étapes clés du cycle infectieux du VHC.....	86
II.2.5.1. Production des particules VHCcc	86
II.2.5.1.1. Production des cellules compétentes	86
II.2.5.1.2. Insertion du plasmide dans les cellules compétentes	87
II.2.5.1.3. Multiplication et extraction du plasmide dans les cellules transformées ampicilline-résistante.....	88
II.2.5.1.4. Linéarisation du plasmide circulaire.....	89
II.2.5.1.5. Transcription <i>in vitro</i> du plasmide linéaire.....	90
II.2.5.1.6. Transfection des cellules Huh7.5 et production des particules VHCcc	90
II.2.5.2. Détermination de la dose infectieuse 50% en culture (TCID ₅₀)	91
II.2.5.2.1. Mesure de l'activité de la luciférase de <i>Gaussia princeps</i>	91
II.2.5.2.2. Détection de l'infection par immunofluorescence indirecte.....	92
II.2.5.3. Effet des composés de KgF25 sur la viabilité des cellules Huh7.5	94

II.2.5.4. Evaluation de l'activité antivirale des composés de KgF25 sur le cycle infectieux du VHC..	94
II.2.5.5. Analyse de l'effet des composés de KgF25 sur l'expression de quelques protéines impliquées dans les interactions cellule hôte-virus au cours du cycle infectieux du VHC.....	95
II.2.5.5.1. Analyse de l'expression du récepteur CD81 par cytométrie en flux	96
II.2.5.5.2. Test de blocage du récepteur CD81	97
II.2.5.5.3. Analyse par <i>Western Blot</i> de l'expression des protéines impliquées dans les étapes de réplication et d'assemblage/libération.....	98
II.2.6. Analyses statistiques	99

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Résultats	100
III.1.1. Caractéristiques des composés isolés de la fraction KgF25 de <i>K. grandifoliola</i>	100
III.1.1.1. Chromatogramme HPLC des sous-fractions actives, des composés purs et analyse des spectres d'absorption.....	100
III.1.1.2. Effet anti-hépatotoxique des sous-fractions actives et des composés isolés de la fraction KgF25 de <i>K. grandifoliola</i> contre la toxicité induite par le CCl ₄ /cisplatine/APAP	102
III.1.1.2.1. Concentrations létales du CCl ₄ /cisplatine/APAP	102
III.1.1.2.2. Viabilité des hépatocytes L-02 en présence des sous-fractions de KgF25 et après induction de la toxicité par le CCl ₄ /cisplatine/APAP	104
III.1.1.2.3. Effet des sous-fractions actives et des limonoïdes isolés à différentes concentrations contre la toxicité induite dans les hépatocytes L-02 par le CCl ₄ /cisplatine/APAP.....	106
III.1.1.2.4. Conclusion partielle 1	114
III.1.2. Effet des limonoïdes isolés sur l'expression des gènes des facteurs moléculaires promoteurs de l'hépatotoxicité et ceux protecteurs des hépatocytes lors du développement de l'hépatotoxicité induite par le CCl ₄ /Cisplatine/APAP	115
III.1.2.1. Expression du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) dans les hépatocytes intoxiqués au CCl ₄ et à l'APAP et traités par les sous-fractions et les limonoïdes isolés de KgF25	115
III.1.2.2. Taux de glutathion (GSH), d'espèces oxygénées réactives (EOR) intracellulaire et du malondialdéhyde (MDA) dans les hépatocytes L-02 intoxiqués au CCl ₄ /cisplatine/APAP en présence des limonoïdes de KgF25	117
III.1.2.3. Effet des sous fractions actives et des limonoïdes isolés de KgF25 sur l'activation du JNK et la translocation mitochondriale du phospho-JNK (p-JNK) dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP/cisplatine.....	121
III.1.2.4. Effet des limonoïdes de KgF25 sur la translocation mitochondriale du Bax et la sortie de l'AIF de la mitochondrie vers le cytosol dans les hépatocytes intoxiqués par l'APAP	124

III.1.2.5. Expression du Mkp-1 dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP ou au cisplatine en présence des sous-fractions actives et limonoïdes isolés	125
III.1.2.6. Translocation nucléaire du Nrf2 dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP/CCl ₄ /cisplatine en présence des limonoïdes de KgF25	127
III.1.2.7. Expression de l'ARNm des enzymes antioxydants dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP/CCl ₄ /cisplatine en présence des limonoïdes isolés de KgF25	127
III.1.2.8. conclusion partielle 2.....	130
III.1.3. Détermination de l'effet des composés isolés de KgF25 sur l'expression des gènes de quelques protéines impliquées dans les interactions VHC-cellule hôte au cours du cycle infectieux du VHC .	131
III.1.3.1. Production des particules infectieuses HCVcc.....	131
III.1.3.2. Effet des limonoïdes de KgF25 sur la viabilité des cellules Huh7.5 et sur les étapes clés du cycle infectieux du VHC	133
III.1.3.3. Inhibition de l'étape d'entrée par les limonoïdes de KgF25 via la diminution de l'expression du récepteur CD81.....	135
III.1.3.4. Effet des limonoïdes de KgF25 sur le niveau d'expression de la NS5B, du PI4KA et de l'OAS-3 au cours de l'étape de réplication du VHC.....	138
III.1.3.5. Effet des limonoïdes de KgF25 sur l'expression du DGAT-1 dans l'étape d'assemblage/libération du cycle infectieux du VHC	140
III.1.3.6. Conclusion partielle 3.....	140
III.2. Discussions.....	142
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	
1. Conclusion générale	159
2. Perspectives	160
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
Références bibliographiques	161
ANNEXES	
Annexes 1: Spectres RMN des composés isolés	A
Annexes 2: Spectres SMHR des composés isolés.....	C

LISTE DES ABREVIATIONS

AIF: *Apoptosis-inducing factor*

ALAT: Alanine aminotransferase

APAP: Acétyl-para-aminophénol

Bax: *Bcl₂-associated X protein*

CAT: Catalase

CE₅₀: Concentration efficace 50

CL₅₀: Concentration létale 50

CYP2E1: Cytochrome P450 2E1

DGAT-1: Diacylglycerol acyltransferase-1

DNV: Danoprevir

EOR: Espèces oxygénées réactives

GSH: Glutathion réduit

GST: Glutathion-S-transférase

H₂DCFDA: 2'-7'-Dichloro-dihydrofluorescein diacetate

HPLC: Chromatographie liquide de haute pression

IF: Immunofluorescence

JNK: *c-Jun N-terminal Kinase*

Keap-1: *Kelch-like ECH-associated protein-1*

KgF25: Fraction au chlorure de méthylène/méthanol (75:25, v/v) de *K. grandifoliola*

KgF25sf: Sous-fraction de KgF25

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MAT1A: *Methionine adenosyltransferase-1A*

Mkp-1: *Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1*

NAPQI: N-acétyl-para benzo-quinone imine

Nrf2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

NS: Non-structurale

OAS-3: *2',5'-Oligoadenylate synthase-3*

PI4KA: *Class III Phosphatidylinositol 4-kinase alpha*

p-JNK: *Phospho-JNK*

RMN: Résonance magnétique nucléaire

SMHR: Spectrométrie de masse en haute résolution

SOD1: *Superoxide dismutase-1*

SP: *JNK inhibitor SP600125*

TCID50: *50 % Tissue culture infectious doses*

VHC: Virus de l'hépatite C

VHCcc: Particule virale infectieuse produite en culture cellulaire

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tailles et principales fonctions des protéines du VHC (Mauss <i>et al.</i> , 2013).....	22
Tableau 2 : Quelques plantes médicinales ayant des propriétés antihépatotoxiques.....	42
Tableau 3: Noms et structures de quelques métabolites secondaires antihépatotoxiques	43
Tableau 4: Noms, structures et protéines cibles de quelques métabolites secondaires des plantes actifs contre le VHC.....	44
Tableau 5: Protocole d'étalonnage du pyruvate de sodium.....	62
Tableau 6: protocole du dosage des protéines	75
Tableau 7: Composition des gels pour SDS-PAGE	77
Tableau 8: Séquences des amorces utilisées pour la qRT-PCR	85
Tableau 9: Index thérapeutique des limonoïdes de KgF25 sur les étapes d'entrée, de réplication et d'assemblage du cycle infectieux du VHC	135

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique du foie et du lobule hépatique (Marrieb, 1999).....	6
Figure 2: Biotransformation hépatique du paracétamol (Jaeschke <i>et al.</i> , 2003)	9
Figure 3: Mécanisme d'intervention du JNK au cours de l'hépatotoxicité induite par l'APAP (Saito <i>et al.</i> , 2010)	10
Figure 4: Biotransformation hépatique du tétrachlorure de carbone et initiation des dommages cellulaires (Recknagel <i>et al.</i> , 1989).....	12
Figure 5: Représentation schématique d'une particule de VHC (Calland <i>et al.</i> , 2012).....	18
Figure 6: Cartographie de l'hépatite C à travers le monde (Mohd-Hanafiah <i>et al.</i> , 2013).....	19
Figure 7: Arbre phylogénétique des souches virales du VHC (Nicot, 2010)	20
Figure 8: Organisation générale et maturation de l'ARN du VHC (Legrand-Abrevanel, 2008)	21
Figure 9: Cycle de vie complet du VHC (Mauss <i>et al.</i> , 2013)	23
Figure 10: Mécanisme de fixation du VHC sur l'hépatocyte (Calland <i>et al.</i> , 2012).....	24
Figure 11: Mécanisme de formation du complexe de réplication du VHC dans la membrane du réticulum endoplasmique (Sarker <i>et al.</i> , 2014)	25
Figure 12: Modèle d'assemblage du VHC dans le réticulum endoplasmique (Tews <i>et al.</i> , 2010).....	27
Figure 13: Le système réplicon subgénomique du VHC (Steimann <i>et al.</i> , 2013).....	32
Figure 14: Quelques exemples de réplicons subgénomiques du VHC (Woerz <i>et al.</i> , 2009).....	33
Figure 15: structure de quelques génomes dérivés de JFH-1 (woerz <i>et al.</i> , 2009).....	35
Figure 16: Voie de signalisation des interférons de type I et III (Pestka <i>et al.</i> , 2004)	39
Figure 17: Structure moléculaire de quelques DAAs.....	40
Figure 18: Photographie de <i>Khaya grandifoliola</i> C.DC.....	46
Figure 19: Carte génétique des virus chimériques J6/JFH-1 (A) et Jc1/GLuc2A (B).....	49
Figure 20: Systèmes chromatographiques utilisés pour les fractionnements	53
Figure 21: Diagramme du fractionnement de l'extrait brut de <i>K. grandifoliola</i>	54
Figure 22: Chambre de Neubauer.....	57
Figure 23: Droite d'étalonnage du pyruvate de sodium	63
Figure 24: Droite d'étalonnage de la BSA	74
Figure 25: Dispositif utilisé pour la préparation et la migration du gel.....	77

Figure 26: Montage du transfert des protéines du gel sur la membrane.....	79
Figure 27: Intégrité et qualité des ARN vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose et par spectrophotométrie	83
Figure 28: Chromatogramme HPLC des sous-fractions actives sélectionnées	100
Figure 29: Chromatogramme HPLC et structures chimiques des composés purifiés	101
Figure 30: Baisse de la viabilité cellulaire et augmentation de l'activité extracellulaire de l'ALAT des hépatocytes L-02 intoxiqués au CCl ₄ /Cisplatine/APAP.....	103
Figure 31: Viabilité cellulaire et activité de l'ALAT dans le milieu d'incubation des hépatocytes L-02 en présence des sous-fractions de KgF25.....	104
Figure 32: Maintien de la viabilité cellulaire et inhibition de la sortie de l'ALAT des hépatocytes L-02 intoxiqués au CCl ₄ /cisplatine/APAP par certaine sous fractions de KgF25.....	105
Figure 33: Effet protecteur des sous-fractions actives de KgF25 contre la toxicité du CCl ₄	107
Figure 34: Effet protecteur des limonoïdes isolés contre la toxicité du CCl ₄	108
Figure 35: Effet protecteur des sous-fractions actives de KgF25 contre la toxicité induite par le cisplatine.....	109
Figure 36: Effet protecteur des limonoïdes isolés contre la toxicité induite par le cisplatine.	110
Figure 37: Effet protecteur des sous-fractions actives de KgF25 contre la toxicité induite par l'APAP	111
Figure 38: Effet protecteur des limonoïdes isolés contre la toxicité induite par l'APAP.....	112
Figure 39: Coloration au PI et DAPI montrant l'effet protecteur des limonoïdes isolés de KgF25 contre la toxicité induite par l'APAP	113
Figure 40: Effet inhibiteur des sous-fractions actives et des composés isolés de KgF25 sur l'expression du CYP2E1 dans les hépatocytes intoxiqués au CCl ₄ /APAP.....	116
Figure 41: Taux du GSH dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP (A), au CCl ₄ (B) et au cisplatine (C) en présence des limonoïdes de KgF25.....	118
Figure 42: Teneur en EOR intracellulaire dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP (A), au CCl ₄ (B) et au cisplatine (C) en présence des limonoïdes de KgF25	119
Figure 43: Production du MDA par les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP (A), au CCl ₄ (B) et au cisplatine (C) en présence des limonoïdes de KgF25.....	120
Figure 44: Phosphorylation du JNK dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP ou au cisplatine en présence des sous-fractions actives et des limonoïdes de KgF25	122
Figure 45: Phosphorylation cytosolique et translocation mitochondriale du phospho-JNK dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP et au cisplatine en présence des limonoïdes isolés de KgF25.....	123

Figure 46: Translocation mitochondriale du Bax et la sortie de l'AIF vers le cytosol dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP en présence des limonoïdes de KgF25.....	124
Figure 47: Expression du Mkp-1 dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP/Cisplatine en présence des sous-fractions actives et des limonoïdes isolés de KgF25.....	126
Figure 48: Effet des limonoïdes de KgF25 sur la translocation nucléaire du Nrf2 dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP/CCL ₄ /cisplatine.....	128
Figure 49: Effet des limonoïdes de KgF25 sur l'expression de l'ARNm des enzymes antioxydants CAT, SOD1, GST et MAT1A dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP/CCL ₄ /cisplatine	129
Figure 50: Transfection et infection des cellules Huh7.5 avec les transcrits d'ARN du virus chimérique Jc1/GLuc2A.....	132
Figure 51: Effet des limonoïdes sur la viabilité cellulaire et inhibition des étapes clés du cycle infectieux du VHC par les limonoïdes de KgF25	134
Figure 52: Analyse de l'effet des limonoïdes de KgF25 sur l'expression du récepteur CD81 par cytométrie de flux.....	136
Figure 53: Immunofluorescence pour la détection de la capsid du VHC montrant l'effet des limonoïdes isolés sur l'étape d'entrée du VHC.....	137
Figure 54: Mécanisme antiviral des limonoïdes de KgF25 sur l'étape de réplication	139
Figure 55: Effet des limonoïdes sur l'expression du DGAT-1 dans l'étape d'assemblage/libération	141
Figure 56: Modèle proposé décrivant les mécanismes moléculaires hépato-protecteurs des limonoïdes de KgF25 contre la toxicité induite par l'APAP	150
Figure 57: Modèle proposé montrant le mécanisme d'action des limonoïdes de <i>K. grandifoliola</i> sur le cycle infectieux du VHC	156

RESUME

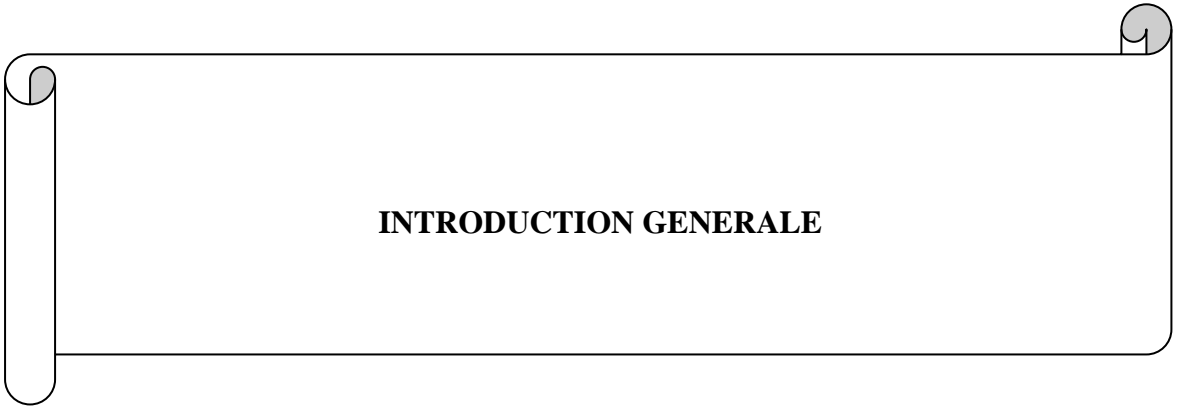
Le but de ce travail a été d'étudier les mécanismes moléculaires des propriétés anti-hépatotoxiques et anti-VHC des composés actifs isolés de *K. grandifoliola*. A cet effet, l'extrait organique de *K. grandifoliola* a été préparé par macération de la poudre des écorces dans le système solvant chlorure de méthylène/méthanol (v/v). Ensuite, la fraction au chlorure de méthylène/méthanol (75:25, v/v), préparée par chromatographie flash à partir de l'extrait organique a été sous-fractionnée par chromatographie sur colonne de gel de silice et les activités anti-hépatotoxiques et anti-VHC des sous-fractions étudiées. S'agissant de l'activité anti-hépatotoxique des sous-fractions, les modèles d'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone (CCl₄), le cisplatine et le paracétamol (APAP) dans les hépatocytes L-02 ont été utilisés. Les tests de viabilité cellulaire au bromure de 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) et de l'intégrité membranaire en mesurant l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT) libérée dans le milieu d'incubation ont été réalisés. Les composés constitutifs ont été purifiés des sous-fractions actives et les structures des composés déterminées. Les propriétés anti-hépatotoxiques des composés isolés ont été évaluées par la suite en mesurant leur effet sur la viabilité cellulaire, l'intégrité membranaire, la génération des espèces oxygénées réactives (EOR), la peroxydation lipidique membranaire et la déplétion du glutathion (GSH) cellulaire. L'expression du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), la phosphorylation du *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), la translocation mitochondriale du phospho-JNK (p-JNK), l'expression du *Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1* (Mkp-1) et la translocation nucléaire du *Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor-2* (Nrf2) ont été évaluées par *western blot*. L'expression des enzymes antioxydants: catalase (CAT), superoxyde dismutase-1 (SOD1) et glutathion-S-transférase (GST) a été quantifiée par *quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction* (qRT-PCR). La silymarine et le JNK *inhibitor* SP600125 ont été utilisés comme composés de référence. Concernant l'activité anti-VHC des composés isolés, ceux-ci ont été testés sur le cycle infectieux du VHC dans la lignée cellulaire Huh7.5 en utilisant le système infectieux VHCcc. Les taux d'infection et de répllication ont été évalués par mesure de l'activité de la luciférase et par immunofluorescence. L'analyse de l'expression des protéines cellulaires [récepteur CD81; *Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha* (PI4KA); *2',5'-oligoadenylate synthase-3* (OAS-3) et *diacylglycerol acyltransferase-1* (DGAT1)] et virale (NS5B) a été fait par cytométrie de flux et par *western blot*. Le Danoprevir et l'anticorps anti-CD81 ont été utilisés comme composés de référence. Comme résultats, trois limonoïdes connus, dénommés 17-épi-méthyl-6-hydroxyangolensate, 7-deacétoxy-7-oxogedunine et deacétoxy-7R-hydroxygedunine responsables des activités anti-hépatotoxique et anti-VHC ont été isolés des sous-fractions actives. Ces limonoïdes protègent les hépatocytes L-02 contre l'hépatotoxicité induite par le CCl₄, le cisplatine et l'APAP principalement en inhibant les dommages oxydatifs, la surexpression du CYP2E1, la phosphorylation du JNK et la translocation mitochondriale du p-JNK induits par ces agents toxiques; et en induisant la translocation nucléaire du Nrf2, l'expression du Mkp-1 et des ARNm des enzymes antioxydants: CAT, SOD1 et GST. Les limonoïdes inhibent l'infection au VHC à travers au moins deux étapes de son cycle infectieux, l'entrée et la répllication. Ces composés inhibent l'entrée du VHC en diminuant l'expression du récepteur membranaire CD81. L'inhibition de la répllication virale a été associée à la diminution de l'expression de la protéine virale NS5B, du facteur hôte PI4KA et à l'induction de la protéine antivirale OAS-3. Ces résultats contribuent à la valorisation de *K. grandifoliola* comme source de composés potentiels pour le traitement des hépatites.

Mots clés: *K. grandifoliola*; anti-hépatites; CYP2E1; p-JNK; Mkp-1; Nrf2; récepteur CD81; NS5B; OAS-3; PI4KA.

ABSTRACT

The aim of this study was to study the molecular mechanisms of active compounds from *K. grandifoliola* triggering anti-hepatotoxic and anti-HCV properties. For this purpose, organic extract of the plant was prepared by maceration of bark powder in the methylene chloride/methanol solvent system (v/v); then, the methylene chloride/methanol (75:25, v/v) fraction prepared by flash chromatography from the organic extract, was sub-fractionated by silica gel column chromatography and the anti-hepatotoxic and anti-HCV activities of the sub-fractions were studied. Regarding, the anti-hepatotoxic activity, hepatotoxicity models induced by carbon tetrachloride (CCl₄), cisplatin and acetaminophen (APAP) in L-02 hepatocyte were used. Cell viability assay with 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) and membrane integrity assay by measuring alanine aminotransferase (ALT) activity leakage into the incubation medium were performed. Constituent compounds were purified from active sub-fractions and the structures of compounds were determined. The anti-hepatotoxic properties of isolated compounds were thereafter assessed by measuring their effects on cell viability, membrane integrity, reactive oxygen species (ROS) generation, lipid membrane peroxidation and cellular glutathione (GSH) depletion. Expression of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), phosphorylation of c-Jun N-terminal Kinase (JNK), mitochondrial translocation of phospho-JNK (p-JNK), the expression of Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1 (Mkp-1) and nuclear translocation of Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor-2 (Nrf2) were assessed by western blot. The expression of antioxidant enzymes: catalase (CAT), superoxide dismutase-1 (SOD1), and glutathione-S-transferase (GST) was quantified by quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction. Silymarin and JNK inhibitor SP600125 were used as reference compounds. Regarding the anti-HCV activity of the isolated compounds, these were assessed on HCV life cycle in Huh7.5 cell line by using the infectious system HCVcc. Infection and replication rate were monitored by measuring luciferase activity and immunofluorescence. The expression of cellular proteins [CD81 receptor; Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha (PI4KA); 2',5'- oligoadenylate synthase-3 (OAS-3) and diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT1)] and viral protein (NS5B) was assessed by flow cytometry and western blot. Danoprevir and anti-CD81 antibody were used as reference compounds. As results, three known limonoids namely 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate, 7-deacetoxy-7-oxogedunin and deacetoxy-7R-hydroxygedunin responsible of the anti-hepatotoxic and anti-HCV activities were isolated from the active sub-fractions. These limonoids protect L-02 hepatocytes against hepatotoxicity induced by CCl₄, cisplatin and APAP mainly by inhibiting oxidative damages, overexpression of CYP2E1, JNK phosphorylation, and mitochondrial translocation of p-JNK induced by these toxic agents; and by increasing the nuclear translocation of Nrf2, the expression of Mkp-1 and mRNA levels of antioxidant enzymes: CAT, SOD1 and GST. The limonoids inhibit HCV infection through at least two steps of its infectious cycle, entry and replication. The inhibitory effect on entry step was attributed to the down-regulation of CD81 receptor expression. In the replication step, the inhibitory effect was manifested via decreasing the expression of NS5B and PI4KA; and up-regulation of OAS-3 expression. These results contribute to the valorization of *K. grandifoliola* as potential source of compounds for the treatment of hepatitis.

Key words: *K. grandifoliola*; anti-hepatitis; CYP2E1; JNK; Mkp-1; Nrf2; CD81 receptor; NS5B; OAS-3; PI4KA.



INTRODUCTION GENERALE

1. Introduction

Le foie est le principal organe du métabolisme, de détoxification et d'excrétion de l'organisme. Son dysfonctionnement est particulièrement préjudiciable pour l'organisme tout entier (**Kumari et Kakkar, 2012a**). C'est pourquoi les hépatites représentent un problème majeur de santé publique dans le monde et spécialement dans les pays en voie de développement où le nombre de patients ne cesse de croître (**Cainelli, 2012**). Les polluants environnementaux (métaux lourds, solvants industriels, mycotoxines...), les médicaments (le paracétamol, le cisplatine...) et les virus dont celui de l'hépatite virale C sont trois causes majeures des hépatites. Toutes ont une progression similaire caractérisée par une inflammation aigüe et chronique du foie associée au stress oxydatif, suivie du développement de la cirrhose et du carcinome hépatocellulaire (**Gao et al., 2012; Ivanov et al., 2013**).

L'hépatotoxicité des médicaments tel que le paracétamol encore appelé N-acétyl-para-aminophénol (APAP) ou des toxiques à l'exemple du tétrachlorure de carbone (CCl_4) est liée non seulement à leur biotransformation en métabolites réactifs (N-acétyl-para-benzoquinone-imine), radicaux libres [trichlorométhyl (CCl_3°) ou trichlorométhyl peroxy ($\text{CCl}_3\text{O}_2^\circ$)], mais aussi à la génération des espèces oxygénées réactives (ROS) qui causent le stress oxydatif et les dommages membranaires (**Jaeschke et al., 2002**). Au niveau moléculaire, on assiste à l'inhibition de l'expression des gènes des enzymes antioxydants, l'activation des voies de signalisation cellulaire dont celle des *Mitogen-activated protein kinases* (MAPKinases), l'activation du système immunitaire avec pour conséquence la mort des hépatocytes et la production des cytokines pro-inflammatoires qui conduisent au développement de la fibrose et de la cirrhose hépatique (**Saito et al., 2010; Miller et al., 2011; Xiao et al., 2012**).

Quant à l'hépatite virale, on estime qu'environ 3 % de la population mondiale sont des porteurs chroniques du virus. Chaque année, près de 4 millions de nouvelles infections sont déclarées. Depuis son identification en 1989, le virus de l'hépatite C (VHC) est devenu la principale cause du développement du cancer de foie, avec plus de 500 000 décès annuellement (**Choo et al., 1989; Averhoff et al., 2012; OMS, 2015**).

Jusqu'à ce jour, le traitement approuvé contre les hépatites toxiques reste le N-acétylcystéine, un précurseur du glutathion cellulaire. Cependant, il présente l'inconvénient qu'il doit être administré moins de 8 h après une intoxication et son utilisation est en outre associée à des effets secondaires sévères tels que les vomissements et les nausées (**Bajt et al., 2004; Bebarta et al., 2010**). En ce qui concerne le VHC, de nouvelles molécules qualifiées d'agents à action directe ou *direct-acting antiviral agents* (DAAs) ont récemment été développées dans le but de renforcer l'arsenal thérapeutique. Comparativement au traitement standard basé sur la combinaison de l'interféron-pegylé avec la ribavirin, cette nouvelle thérapie permet d'atteindre un taux de guérison de 90 % avec l'avantage d'être mieux tolérée (**Keating, 2015; Liu et al., 2015a**). Cependant, si ces nouvelles molécules sont efficaces, elles ne sont pas accessibles pour la plupart des patients infectés, particulièrement dans les pays en développement à cause de leurs coûts relativement élevés et, le traitement standard y est toujours utilisé. Bien plus, le développement des résistances, à cause de leur mode d'action ciblant uniquement les protéines virales comme il a été rapporté avec les premiers DAAs (le boceprevir et le télaprevir) est un important problème (**Sarrazin, 2010**). Par conséquent il est important de rechercher de nouvelles alternatives thérapeutiques efficaces et agissant sur plusieurs cibles pour la lutte contre les hépatites.

A cet effet, les plantes sont une source potentielle de molécules capables de protéger le foie contre les processus pathologiques mentionnés ci-dessus (**Madrigall-Santillan et al., 2014**). C'est le cas de *Khaya grandifoliola*, une plante appartenant à la famille des Meliaceae.

Au Cameroun, *K. grandifoliola* est utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement de la jaunisse et d'autres maladies du foie (**Moundipa et al., 2002**). Des enquêtes ethnobotaniques effectuées au Nigéria ont aussi rapporté que cette plante est utilisée pour le traitement du paludisme, de l'anémie, de l'arthrite et de la fièvre (**Obugbemi et al., 2007; Olowokudejo et al., 2008**). Les études pharmacologiques sur cette plante ont démontré les activités antipaludiques (**Makindé et al., 2006**), antibactériennes (**Stephen et al., 2009**), antianémiques (**Adeyemi and Gbilade, 2006**), anti-inflammatoires (**Falodum et al., 2009; Owona, 2015**) et antifongiques (**Onifade, 2006**). Les études phytochimiques ont permis l'isolement et la caractérisation de 11 limonoïdes parmi lesquels le grandifotane A (**Yuan et al., 2010**), le méthylangolensate et la gedunin qui possèdent des activités anti-plasmodiales (**Bickii et al., 2000; Makinde et al., 2006**). De récentes études par ailleurs, ont démontré que l'extrait des écorces avec le mélange chlorure de méthylène/méthanol (1:1, v/v) possède de fortes propriétés anti-hépatotoxiques et antivirales contre le virus de l'hépatite C (VHC) et une fraction au chlorure de méthylène/méthanol (75:25, v/v) de cet extrait nommée « KgF25 » capable d'activer le système antioxydant cellulaire et d'inhiber les étapes clés (entrée, réplication et assemblage/libération) du cycle infectieux du VHC a été isolée. (**Njayou et al., 2013; Njayou et al., 2015; Njayou et al., 2016; Galani et al., 2016a**). Cependant, aucune étude démontrant les mécanismes moléculaires anti-hépatotoxiques et anti-VHC des constituants actifs de cette fraction active n'a encore été menée.

Sachant que la progression des maladies hépatiques est contrôlée par une large variété de médiateurs cellulaires parmi lesquels les facteurs de transcription, les enzymes ou encore les récepteurs membranaires (**Gao et al., 2012**), toute substance capable de moduler positivement l'expression de ces médiateurs cellulaires serait un potentiel candidat médicament pour le traitement des hépatites. Ainsi, la présente étude visait à examiner les

mécanismes moléculaires des propriétés anti-hépatotoxique et antivirale (contre le VHC) des composés actifs isolés de *K. grandifoliola*.

2. Hypothèse de recherche

K. grandifoliola renferme des composés actifs qui induisent ou répriment:

- L'expression des gènes des médiateurs cellulaires intervenant dans le développement des hépatites toxiques;
- L'expression des gènes des protéines virales et de la cellule hôte impliqués dans le cycle de vie du virus de l'hépatite C.

3. Objectifs

3.1. Objectif général

L'objectif général de ce travail a été d'étudier *in vitro* un aperçu des mécanismes moléculaires des propriétés anti-hépatotoxiques et anti-VHC de quelques composés isolés de la fraction active KgF25 de *K. grandifoliola*.

3.2 Objectifs spécifiques

Plus spécifiquement, il s'agissait de:

- ✓ Isoler de la fraction KgF25 de *K. grandifoliola* quelques composés possédant les activités anti-hépatotoxiques et anti-VHC.
- ✓ Déterminer l'effet de ces composés sur l'expression des gènes de quelques facteurs moléculaires promoteurs de l'hépatotoxicité et ceux protecteurs des hépatocytes.
- ✓ Déterminer l'effet des composés sur l'expression des gènes de quelques protéines impliquées dans les interactions VHC-cellule hôte au cours des étapes clés (entrée du virus, réplication et assemblage/libération des virions) du cycle infectieux du VHC.



CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Généralités sur le foie (Marrieb, 1999)

Organe volumineux, le foie est la plus grande glande de l'organisme. Le foie et la vésicule biliaire assurent un certain nombre de fonctions essentielles de l'organisme parmi lesquelles la fonction de désintoxication. Du fait de l'importance de cet organe, les maladies qui l'affectent sont souvent préoccupantes.

I.1.1. Anatomie et vascularisation du foie

Sur le plan anatomique, le foie est situé dans l'abdomen, sous la coupole diaphragmatique droite. Sa forme est généralement triangulaire, sa face supérieure convexe, suit les contours du diaphragme. Sa face inférieure est parcourue par trois sillons, l'un d'eux est le hile du foie, où convergent les vaisseaux sanguins qui arrivent au foie ou en partent. Organe entouré d'une capsule fibreuse, la capsule de Glisson, le foie est formé de deux lobes principaux (Figure 1A), le droit et le gauche, séparés par un ligament rond et falciforme, et de deux petits lobes, le lobe caudé, situé à la face postérieure et le lobe carré, situé à la face inférieure.

Le foie est très vascularisé, ce qui lui confère une couleur rouge foncée. Près d'un litre et demi de sang traversent cet organe par minute. Le foie est alimenté en sang artériel oxygéné par l'artère hépatique. Il reçoit en outre par la veine porte le sang provenant de l'ensemble du tube digestif. Aux côtés de ces deux vaisseaux circule le canal hépatique, qui draine hors du foie la bile que celui-ci a sécrété. Le sang qui est passé à travers le filtre hépatique est conduit au cœur par la veine sus-hépatique.

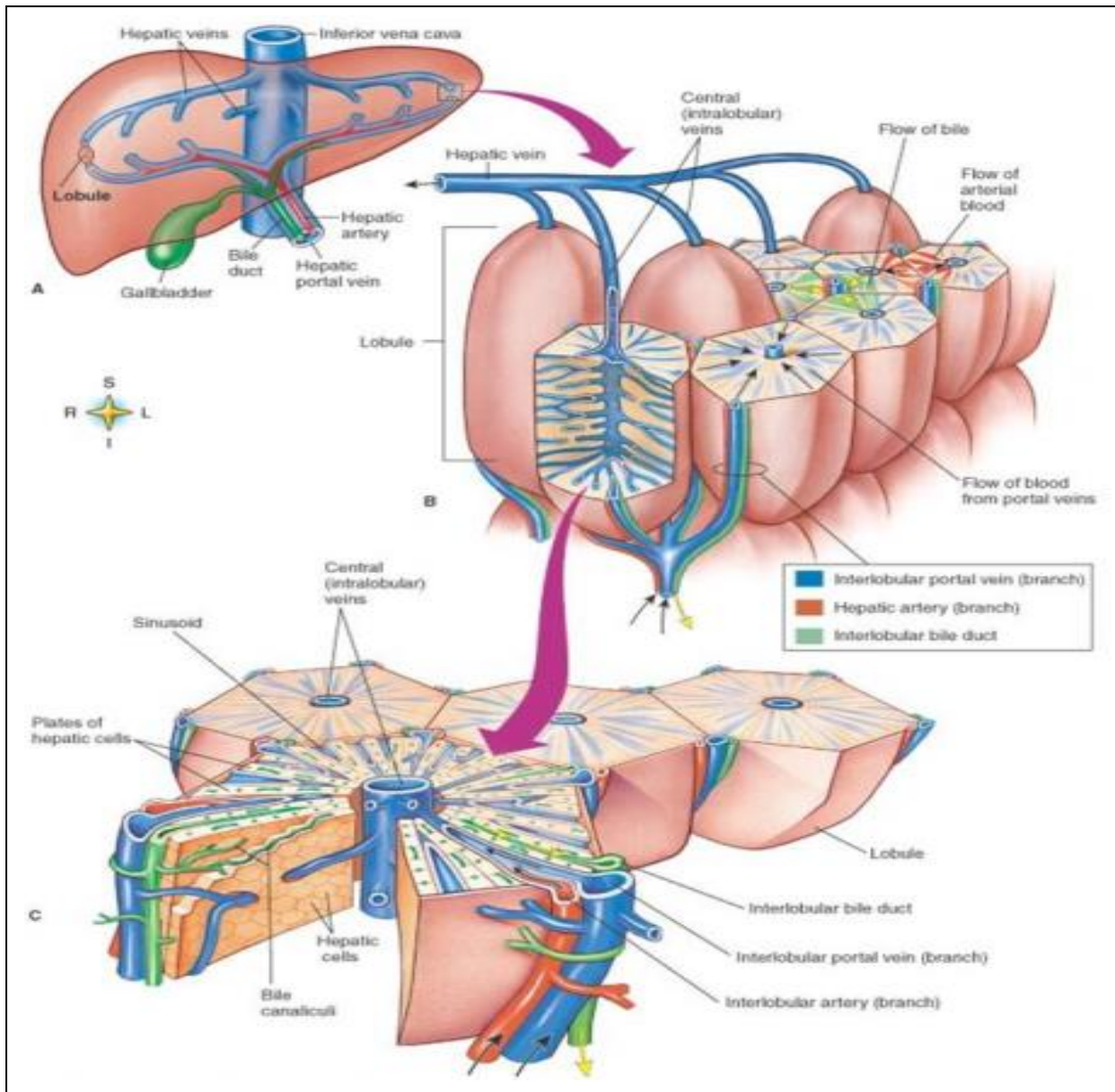


Figure 1: Représentation schématique du foie et du lobule hépatique (Marrie, 1999)

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

I.1.2. Histologie du foie

Sur le plan histologique, le foie est principalement constitué de deux grands types de cellules:

- ✓ Les hépatocytes ou cellules parenchymateuses;
- ✓ Les cellules sinusoidales ou cellules non parenchymateuses.

I.1.2.1. Les hépatocytes

Ce sont des cellules volumineuses polyédriques dont la taille (20 à 30 μm) varie en fonction de l'activité métabolique. Ils représentent environ 70 % de la population cellulaire du foie humain. Les hépatocytes possèdent un grand noyau entouré d'un cytoplasme riche en organites qui témoignent de leurs multiples fonctions. On peut citer entre autre:

- Les mitochondries qui participent à la phosphorylation oxydative et à l'oxydation des acides gras;
- Le réticulum endoplasmique granuleux ou ergastoplasme qui possède des fonctions importantes dans la synthèse de l'albumine, du fibrinogène et des autres protéines de la coagulation;
- Le réticulum endoplasmique lisse qui intervient dans la conjugaison de la bilirubine, l'estérification des acides gras, la glycogénolyse, la synthèse du cholestérol et des acides biliaires. Il est le siège principal du métabolisme des lipides, des stéroïdes et des xénobiotiques;
- L'appareil de Golgi qui est impliqué dans la production des glycoprotéines et de l'adjonction de la composante glucidique aux glycoprotéines.

I.1.2.2. Les cellules sinusoïdales

Les sinusoides sont des capillaires sans membrane basale. Elles sont constituées de plusieurs autres types de cellules: les cellules de Pit, les cellules de Kuppfer, les cellules endothéliales des capillaires sinusoïdales, les cellules étoilées et les cellules épithéliales biliaires.

I.1.3 Fonctions du foie

Le foie est l'organe principal impliqué dans le métabolisme et l'excrétion. A ce titre, plusieurs fonctions lui sont dévolues:

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

De même que le foie assure plusieurs fonctions, il est susceptible à des maladies provoquant ainsi son dysfonctionnement.

I.2. Les maladies du foie

Elles sont désignées par le terme hépatite. Suivant leur étiologie, on distingue les hépatites toxiques, virales et parasitaires. Parmi celles-ci, les hépatites toxiques et virales tiennent une place majeure dans le développement de la cirrhose et du cancer du foie.

I.2.1. Les hépatites toxiques

Les médicaments tels que le paracétamol, le cisplatine et les solvants industriels à l'exemple du tétrachlorure de carbone font partie des substances capables de provoquer les hépatites toxiques. Ces composés sont bio-transformés au niveau du foie en métabolites réactifs qui endommagent les hépatocytes entraînant ainsi l'hépatotoxicité. La compréhension du mécanisme de la toxicité induite par ces composés est fondamentale pour tout essai thérapeutique (**Jaeschke *et al.*, 2013**).

I.2.1.1. Mécanisme moléculaire de l'hépatotoxicité induite par le paracétamol

Le paracétamol ou N-acétyl-para-aminophénol (APAP) est l'analgésique et l'antipyrétique de référence le plus utilisé à travers le monde. Il est recommandé à la dose thérapeutique de 4 g par jour par kilogramme de masse corporelle et est bien supporté par l'organisme à cette dose (Nourjah *et al.*, 2006). Ingré à de fortes doses, il constitue un risque important de dommages pour le foie. Dans les cas sévères, ces surdoses peuvent entraîner la mort (Park *et al.*, 2005). Une fois ingéré, l'APAP est largement métabolisé au niveau du foie par les enzymes de la phase II des réactions de biotransformations (figure 2). Environ 60 % sont transformés en conjugués glucuronides, 35 % en dérivés sulfates et 5 % pris en charge par les enzymes du cytochrome P450 2E1 et bio-transformés en N-acétyl-para-benzoquinone-imine (NAPQI), le métabolite réactif responsable de la toxicité de l'APAP (Jaeschke *et al.*, 2003).

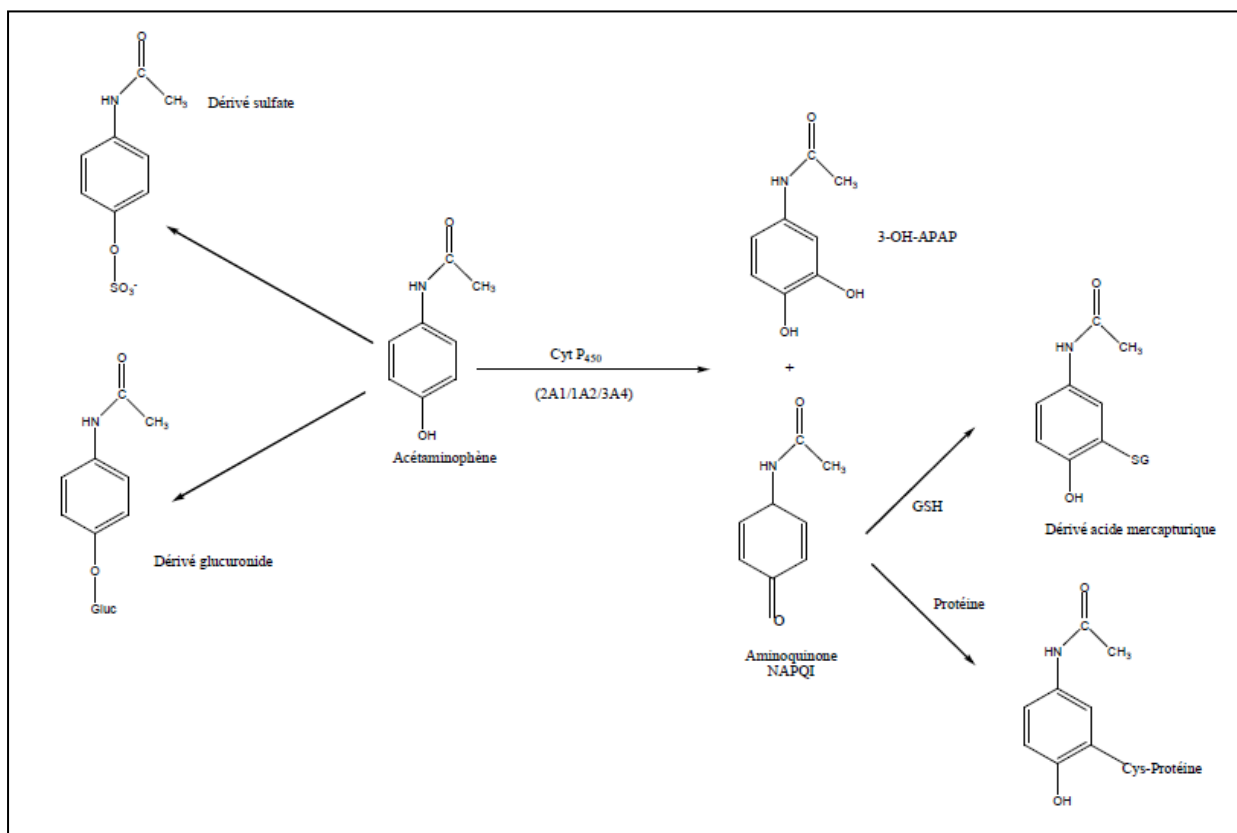


Figure 2: Biotransformation hépatique du paracétamol (Jaeschke *et al.*, 2003)

En cas de surdosages, les voies de conjugaison en dérivés glucuronides et sulfates deviennent saturées et celle du cytochrome P450 majoritairement utilisée. L'excès de NAPQI qui en résulte fixe les réserves de glutathion cellulaire, se lie de manière covalente aux protéines spécialement celles de la membrane mitochondriale, causant le dysfonctionnement mitochondriale et le stress oxydatif (Jaeschke *et al.*, 2002). Ce stress oxydatif provoque non seulement la peroxydation des lipides membranaires avec pour conséquence la perte de l'intégrité membranaire; mais aussi l'activation de la voie de signalisation des *Mitogene-activated Protein Kinases* (MAP-Kinases). L'activité des différentes kinases converge à la phosphorylation de la protéine c-Jun N-terminal Kinase (p-JNK) qui migre dans la mitochondrie et amplifie le stress oxydatif et la formation des peroxy-nitrites (figure 3).

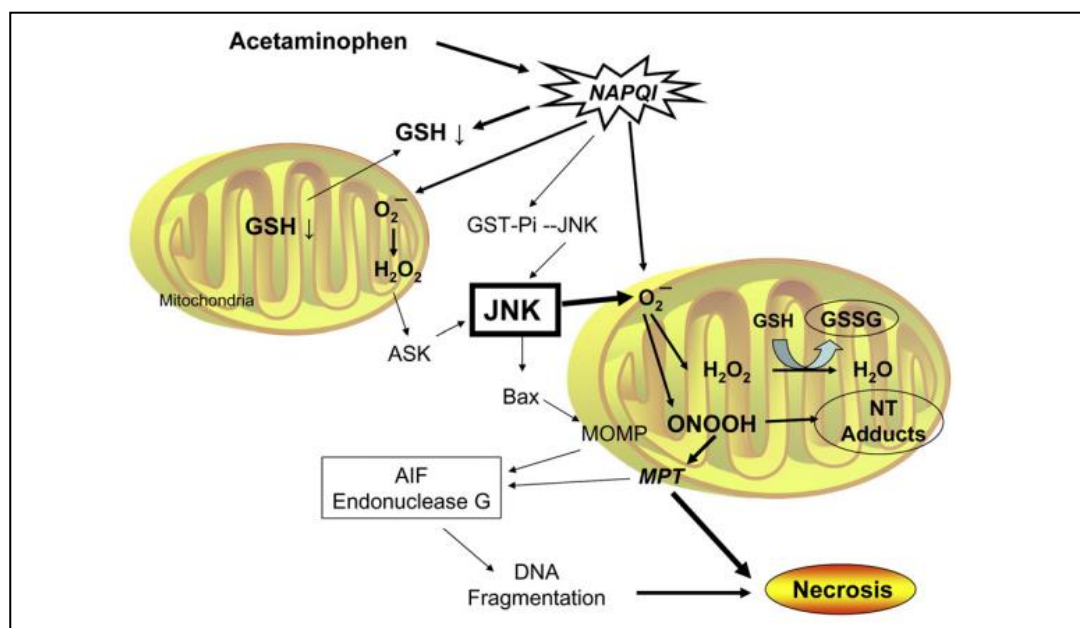


Figure 3: Mécanisme d'intervention du JNK au cours de l'hépatotoxicité induite par l'APAP (Saito *et al.*, 2010)

JNK: c-Jun N-terminal Kinase; ASK: Apoptosis Signal-regulating Kinase-1; Bax: Bcl2-Associated X protein; AIF: Apoptosis-Inducing Factor; MPT: Membrane Permeability Transition pore; GSH: Glutathione; NAPQI: N-acétyl-para-benzoquinone-imine.

Le stress oxydatif mitochondrial conduit d'une part à l'ouverture des pores de la perméabilité de la transition membranaire et à l'arrêt de la synthèse d'ATP. D'autre part, à la rupture de la membrane externe mitochondriale et la libération des protéines inter-

membranaires telles que l'Endonuclease G et l'*Apoptosis-Inducing Factor* (AIF), qui migrent par la suite dans le noyau et provoquent la fragmentation de l'ADN (**Hanawa et al., 2008; Saito et al., 2010; Jaeschke et al., 2012**). Ensemble, ces événements sont considérés comme principale cause de mort cellulaire au cours de l'hépatotoxicité induite par l'APAP.

I.2.1.2. Mécanisme moléculaire de l'hépatotoxicité induite par le cisplatine

Le cisplatine ou cis-diamine-dichloro-platinum-II est l'un des anticancéreux les plus utilisés dans le monde. Son utilisation prolongée est toxique pour le foie. Le mécanisme par lequel le cisplatine induit la toxicité n'est pas clairement élucidé. Cependant, des études ont montré que son hépatotoxicité est associée au stress oxydatif caractérisé par une surproduction d'espèces oxygénées réactives (EOR) parmi lesquelles les radicaux superoxydes (O_2°) et hydroxyles (HO°) (**Chirino et pedraza-Chaveri, 2008; Pratibha et al., 2006**). Ces EOR très réactives entraînent la déplétion du glutathion et l'inactivation des enzymes antioxydants (**Liao et al., 2008**). Elles ont également la capacité de s'attaquer aux macromolécules biologiques provoquant les dommages sur l'ADN, l'oxydation des protéines et des lipides avec pour conséquences la perte de l'intégrité membranaire et la mort des cellules (**Palipoch and Punsawad, 2013 ; Palipoch et al., 2014**). De plus, il a été démontré que la toxicité du cisplatine est associée également à la phosphorylation (activation) du JNK. Le JNK activé migre dans la mitochondrie et perpétue les dommages hépatiques en altérant le statut redox et en induisant le dysfonctionnement mitochondrial (**Hong et al., 2005; Song et al., 2008**).

I.2.1.3. Mécanisme moléculaire de l'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone

Le tétrachlorure de carbone (CCl_4) est une substance chimique qui, ingéré ou inhalé par accident, active l'isoforme 2E1 du cytochrome P450 (CYP2E1) qui le métabolise en

radical trichlorométhyl (CCl_3°) (figure 4). Ce dernier réagit rapidement avec l'oxygène moléculaire pour former le radical trichlorométhyl peroxy ($\text{CCl}_3\text{OO}^\circ$) qui est le métabolite réactif responsable de la toxicité du CCl_4 (Brattin *et al.*, 1985; Recknagel *et al.*, 1989). Ce métabolite provoque la déplétion du glutathion et l'inhibition des enzymes antioxydants avec pour conséquence une surproduction d'EOR. L'excès d'EOR et de $\text{CCl}_3\text{OO}^\circ$ initient par la suite le processus de peroxydation lipidique entraînant la destruction de la membrane plasmique et la mort des hépatocytes par nécrose (Zhu and Fung, 2000; Chen *et al.*, 2013).

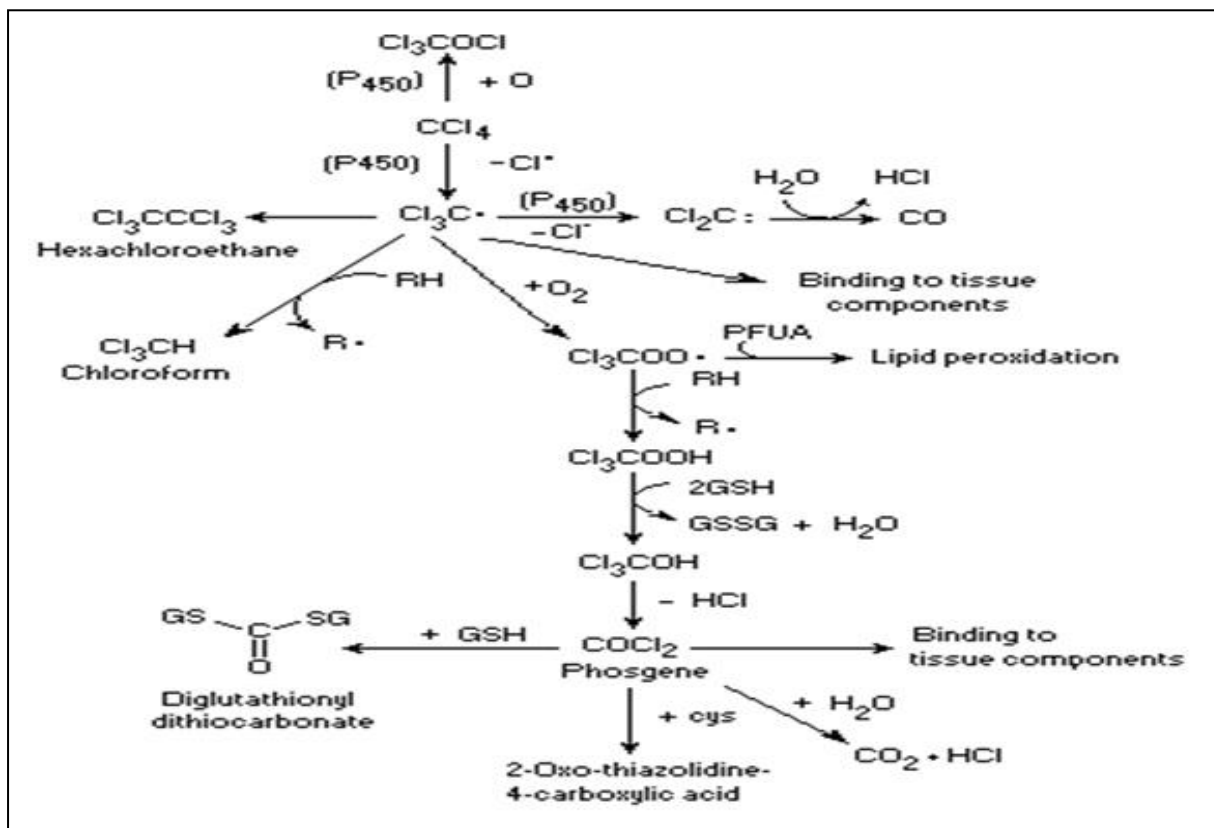


Figure 4: Biotransformation hépatique du tétrachlorure de carbone et initiation des dommages cellulaires (Recknagel *et al.*, 1989)

I.2.1.4. Systèmes de protection des hépatocytes contre les toxiques

Pour se protéger contre les phénomènes de toxicité induits par les radicaux libres et les métabolites réactifs provenant du métabolisme des xénobiotiques, les hépatocytes disposent des systèmes antioxydants enzymatiques ou non qui éliminent ces composés (Germain *et al.*, 2003).

➤ **Les systèmes endogènes enzymatiques**

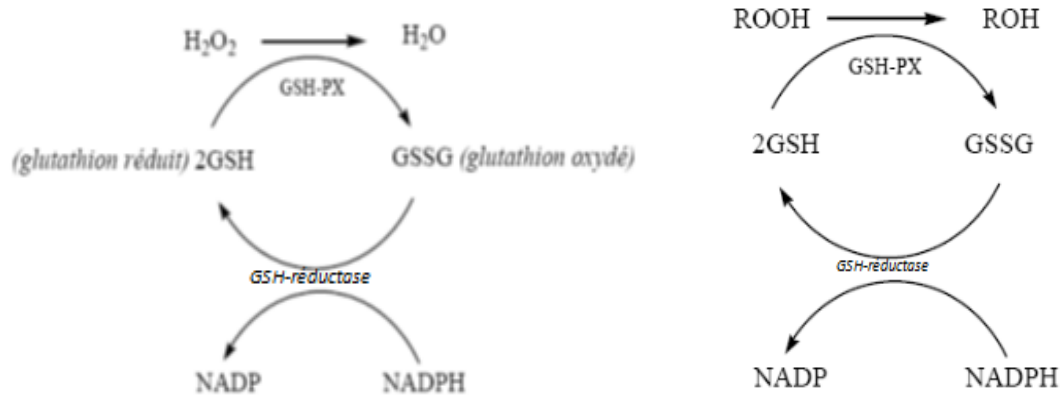
➤ **La superoxyde dismutase (SOD)**

Cette enzyme assure l'élimination de l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène. Elle représente ainsi la première ligne de défense contre le stress oxydant. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au centre actif de l'enzyme dont la nature distinguera les superoxydes dismutases (**Mates *et al.*, 1999; Milane, 2004**): la SOD à manganèse (Mn-SOD) qui protège la mitochondrie et la SOD à cuivre-zinc (Cu-ZnSOD) qui protège le cytosol.



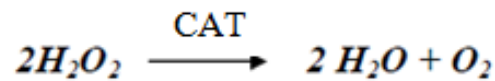
➤ **Le système glutathion peroxydase (GSH-Px)**

Les enzymes de ce système sont séléno-dépendants et renferment 4 atomes de sélénium situés aux centres actifs des enzymes sous forme de sélénocystéine (**Milane, 2004**). Ces enzymes détruisent non seulement le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol (**Favier, 2003**). L'activité de ces enzymes nécessite la présence du glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons. Le glutathion oxydé (GSSG) produit est à nouveau réduit par le glutathion réductase qui utilise le NADPH comme donneur d'électrons. Les GSH-Px agissent vis-à-vis de 2 substrats: le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes (RCOOH) dérivées des lipides comme présenté sur les équations ci-après.



➤ **La catalase (CAT)**

La catalase est une enzyme répartie dans les tissus hépatiques. Elle catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



Elle empêche ainsi le peroxyde d'hydrogène de se transformer en radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

➤ **Les systèmes endogènes non enzymatiques**

• **Les protéines de stress thermiques**

Ces protéines interviennent dans la réparation des dommages oxydatifs induits au niveau des protéines par un stress oxydant (**Favier, 2003**).

• **Les antioxydants non enzymatiques**

Parmi ces antioxydants, on compte les thiols (SH) dont certains sont synthétisés *in vivo*, comme le glutathion (GSH). Le GSH est un tri-peptide (γ-Glu-Cys-Gly) dont la

concentration intracellulaire est importante puisqu'elle est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} mol/L (Favier, 2003). La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant réducteur qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, en particulier de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles comme le montre les réactions suivantes:



Toutefois, le rôle protecteur du GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux centrés sur le carbone (Gardès *et al.*, 2003).



I.2.1.5. Focus sur quelques facteurs moléculaires régulant les hépatites toxiques

➤ Cytochrome P450 2E1

Le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) joue un rôle majeur dans le développement des hépatites toxiques à cause de sa capacité à métaboliser et activer plusieurs substances parmi lesquelles l'éthanol, les médicaments et les solvants industriels en métabolites réactifs plus toxiques et à générer les EOR qui conduisent au stress oxydatif (Jimenez-Lopez et Cederbaum, 2005).

➤ C-Jun N-terminal Kinase (JNK) et Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-1 (MKP-1)

Les protéines JNK sont les membres de la famille des MAP kinases qui régulent divers processus cellulaires hépatiques dont l'apoptose des hépatocytes et les maladies du foie telles que le développement de la stéatose hépatique (Singh *et al.*, 2009). Au cours de

l'hépatotoxicité induit par l'APAP ou le cisplatine, les protéines JNK sont activées (phosphorylées), et leur activation perpétue les dommages hépatiques en altérant le statut redox, en modulant l'activité de la famille des protéines Bcl-2 et inhibant la biogénèse mitochondriale ainsi que la synthèse d'ATP (Nakagawa *et al.*, 2008; Gunawan *et al.*, 2006). L'ensemble des iso-formes JNK-1 et JNK-2 sont exprimés dans le foie et l'inhibition simultanée de l'activation de ces deux iso-formes protège contre l'hépatotoxicité (Hanawa *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2014; Omar *et al.*, 2016). Depuis que les protéines JNK émergent comme des médiateurs clés dans les dommages hépatiques induites par les médicaments, certaines études ont examiné des inhibiteurs exogènes et endogènes de l'activation du JNK pour leur potentielle utilisation en thérapie (Saito *et al.*, 2010; Hanawa *et al.*, 2008). Parmi les potentiels inhibiteurs endogènes figurent les protéines de la sous famille Mkp de la famille des *Dual Specificity-protein Phosphatase* (DUSP).

Dans les cellules des mammifères, les protéines Mkp sont les phosphatases primaires responsables de la déphosphorylation des MAP kinases (Keyes, 2000). Mkp-1, aussi connu sous le nom de DUSP-1, est le prototype de la famille des Mkp qui inactive préférentiellement le stress induit par les MAP Kinases, notamment les protéines JNK et P38 dans la plupart des tissus (Hammer *et al.*, 2006). Wancket *et al.* (2012) ont démontré qu'une déficience en Mkp-1 renforce l'hépatotoxicité par une activation prolongée du JNK hépatique au cours de l'overdose d'APAP chez la souris. De plus, l'induction de l'expression du Mkp-1 par la S-adénosylmethionine protège les hépatocytes humain et de la souris contre les dommages hépatiques à travers l'inhibition de la phosphorylation du JNK (Tomasi *et al.*, 2010). Ces données montrent que le Mkp-1 représente un nouveau facteur endogène hépatoprotecteur au cours de l'hépatotoxicité.

➤ *S-adenosyl-L-methionine (SAM) et Methionine adenosyltransferase-1 (MAT-1)*

Dans le foie, la SAM est le précurseur du GSH à travers sa conversion en cystéine par la voie de trans-sulfuration. La SAM est particulièrement importante dans le piégeage des radicaux libres générées par divers toxiques parmi lesquels l'alcool, les solvants industriels et les médicaments (**Lieber, 2002**). MAT-1 est l'enzyme responsable de la synthèse de la SAM, principal précurseur du GSH. Les dommages hépatiques causés par une déplétion en GSH sont largement liés à l'inhibition de l'activité de la MAT-1 (**Cederbaum, 2010**). L'induction de la SAM à travers la MAT-1 protège contre hépatotoxicité induite par le CCl₄, l'APAP et l'ischémie re-perfusion (**Brown et al., 2010**).

➤ *Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)-related factor-2 (Nrf2)*

Les EOR générées au cours du métabolisme des xénobiotiques sont éliminées par les enzymes antioxydants tels que la SOD, la GSH-Px et la CAT. Dans le foie, l'induction de ces enzymes antioxydants est régulée par le facteur de transcription Nrf2, qui joue un rôle central dans l'activation de l'expression des gènes dirigés par les protéines désignées *Antioxidant Response Element* (ARE) (**Copple et al., 2008**). Normalement, le facteur Nrf2 est dans un état inactif dans le cytoplasme, séquestré par son suppresseur, le *Kelch-like ECH-associated protein-1* (Keap-1). Suite à une stimulation, ce dernier se dissocie du Keap-1, migre dans le noyau, se lie au promoteur des ARE et induit l'expression des enzymes antioxydants (**Niture et al., 2010**).

I.2.2. Les hépatites virales: cas particulier de l'hépatite virale C (HVC)

I.2.2.1. Description du virus de l'hépatite C (VHC)

Le VHC appartient à la famille des Flaviviridae qui elle-même comporte trois genres: les Flavivirus, les Pestivirus et les Hépacivirus. Il est du genre Hepacivirus et de l'espèce C (virus de l'hépatite C).

Sur le plan structural, le VHC est un petit virus de 50 à 60 nm de diamètre (figure 5). Il est composé de l'extérieur vers l'intérieur: d'une enveloppe lipidique constituée d'apolipoprotéines et des glycoprotéines E1 et E2 transmembranaires; de la capsidie icosaédrique formée par la polymérisation de la protéine C ou core; et d'un génome à ARN monocaténaire positif (**Ishida *et al.*, 2001**).

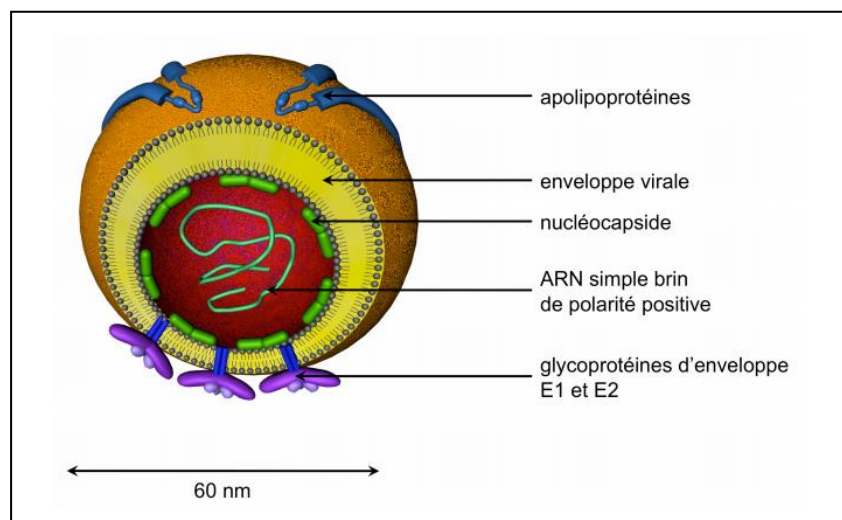


Figure 5: Représentation schématique d'une particule de VHC (Calland *et al.*, 2012)

I.2.2.2. Prévalence et variabilité génétique du VHC

Plus de 20 ans après sa découverte (en 1989), l'hépatite virale C est devenue une infection endémique dans tous les pays du monde et est considérée comme un problème majeur de santé publique. Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé

(OMS), chaque année, 3 à 4 millions de personnes sont infectées par le VHC; environ 170 millions d'individus sont des porteurs chroniques; et plus de 500 000 décès suite à des pathologies liées au VHC sont enregistrés (OMS, 2015).

Selon une étude épidémiologique assez récente (figure 6), l'Asie centrale et orientale et l'Afrique du Nord sont des régions de haute endémicité avec une prévalence supérieure à 3,5 %. L'Asie du Sud, l'Afrique subsaharienne et l'Amérique centrale et latine, l'Océanie et l'Europe sont des régions à prévalence modérée (1,5-3,5 %). L'Amérique du Nord et l'Amérique latine tropicale sont des régions de faible prévalence (<1,5 %) (Mohd-Hanafiah *et al.*, 2013). Au Cameroun, sa prévalence est de 1,03% (Njouom *et al.*, 2015). A ce jour, le VHC existe sous 7 génotypes avec de nombreux sous-types décrits (figure 7); les génotypes 1, 2 et 3 étant les plus répandus (Simmonds *et al.*, 2005; Nicot, 2010).

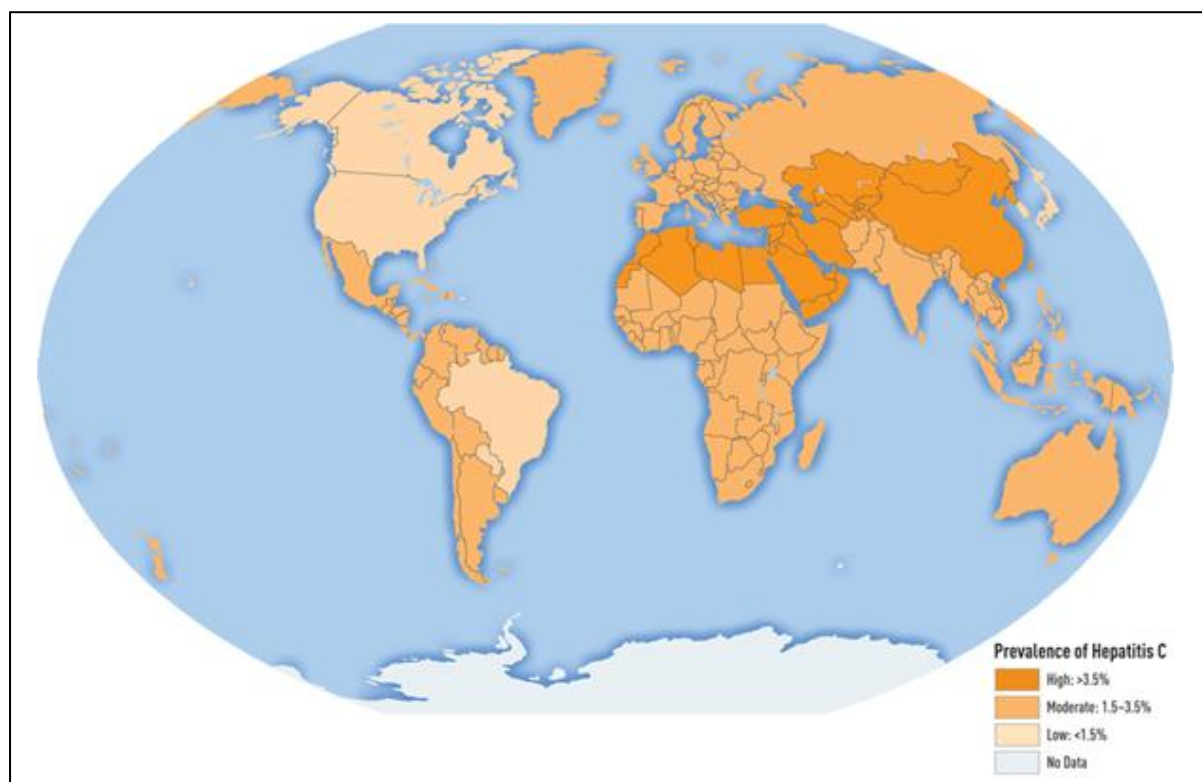


Figure 6: Cartographie de l'hépatite C à travers le monde (Mohd-Hanafiah *et al.*, 2013)

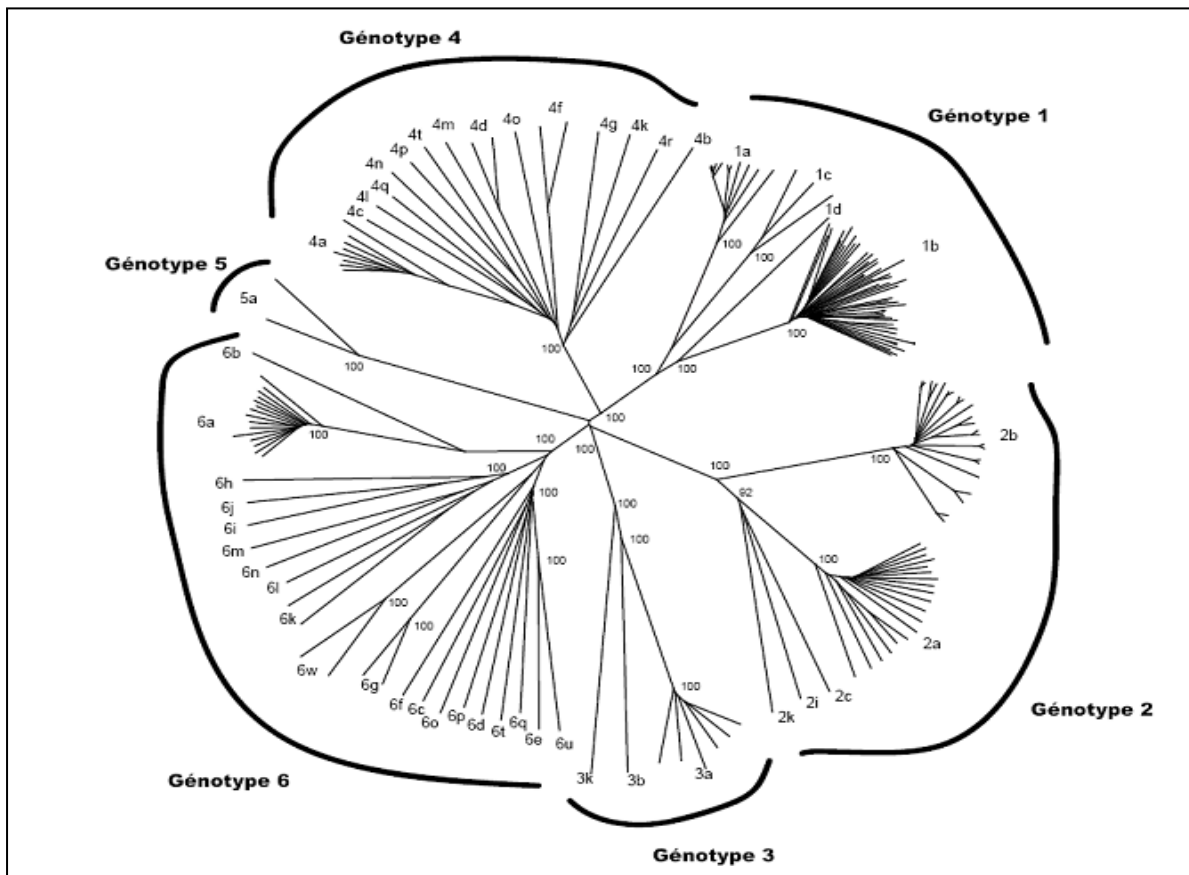


Figure 7: Arbre phylogénétique des souches virales du VHC (Nicot, 2010)

I.2.2.3. Organisation génomique et protéines virales

Le génome du VHC est un ARN monocaténaire de polarité positive constitué d'environ 9,6 kilo base. Il est composé d'un cadre de lecture ouvert (*Open Reading Frame* ou ORF) encadré par les régions no-codantes (*Un-Translated Region* ou UTR) aux extrémités 3' et 5' fortement structurées et relativement bien conservées (Moradpour *et al.*, 2007). La figure 8 présente l'organisation générale et la traduction du génome viral.

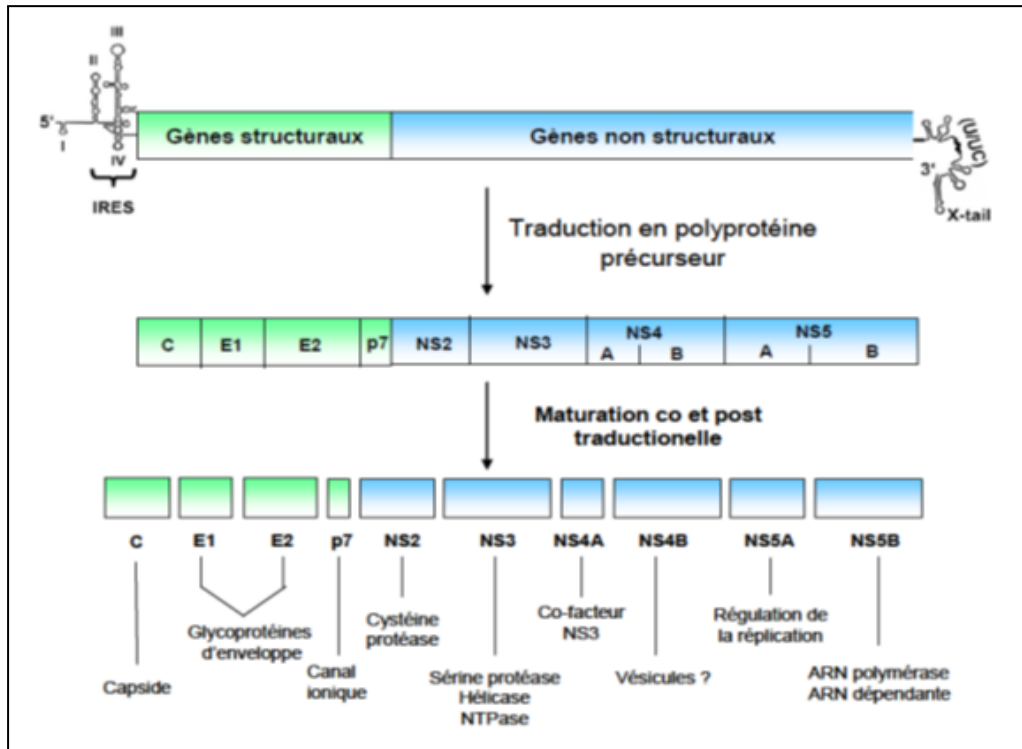


Figure 8: Organisation générale et maturation de l'ARN du VHC (Legrand-Abravanel, 2008)

Au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique, l'ORF code une poly-protéine précurseur d'environ 3000 acides aminés. Ce précurseur est ensuite clivé pour former deux types de protéines: les protéines structurales à savoir la protéine de la capsidite ou core, les glycoprotéines E1 et E2 de l'enveloppe; et les protéines non-structurales ou NS (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) (Moradpour *et al.*, 2007). Entre les deux, se trouve la viroporine p7, généralement classée comme NS, mais aussi parfois comme structurale. Les protéines structurales sont clivées par les protéases cellulaires tandis que les protéines NS le sont par les protéases virales (Calland *et al.*, 2012). Ces protéines remplissent des fonctions précises au cours du cycle viral. Le tableau 1 ci-après présente la taille et la fonction de ces protéines.

Tableau 1 : Tailles et principales fonctions des protéines du VHC (Mauss *et al.*, 2013)

Protéines du VHC	PM (kDa)	Fonctions
Capside ou core	21	Forme la nucléocapside, régule la réplication de l'ARN et l'assemblage viral.
Glycoprotéine E1	35	Protéine transmembranaire de l'enveloppe virale, impliquée dans l'adsorption et la fusion virale.
Glycoprotéine E2	70	Déterminant majeur de l'entrée, important dans l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires. Participe à l'endocytose médiée par les corécepteurs cellulaires
p7	7	Viroporine Augmente la perméabilité membranaire dans la cellule hôte par la formation d'un canal calcique. Permet la libération des virions infectieux
NS2	21	Autoprotéase NS2-3 qui catalyse le clivage de la polyprotéine précurseur entre NS2 et NS3.
NS3	70	Composante de la NS2-3 Possède une activité protéinase NS3-4A Possède une activité NTPase/hélicase Permet l'attachement et le déroulement de l'ARN viral
NS4A	4	Cofacteur de la protéinase NS3-4B
NS4B	27	Intervient dans la réplication virale. Induit la formation des <i>membranous web</i>
NS5A	56-58	Phosphoprotéine multifonctionnelle. Contient une région appelée ISDR (<i>interferon sensitivity determining region</i>) qui joue un rôle important dans l'inhibition de la réponse antivirale à l'IFN- α . Induit la formation des complexes de réplication
NS5B	66-68	ARN polymérase ARN-dépendante. Incorpore les erreurs dans la séquence nucléotidique à raison de 1/1000.

NS: protéines non structurales; IFN- α : interferon alpha.

I.2.2.4. Cycle de vie ou cycle infectieux du VHC

La multiplication du VHC dans les hépatocytes présente plusieurs étapes (figure 9):

- L'entrée: qui regroupe l'attachement, l'endocytose et la fusion;
- La réplication: qui implique la traduction et la synthèse des protéines virales, puis la réplication de l'ARN génomique;
- L'assemblage et la sécrétion des virions;
- La transmission cellule à cellule des virions néo-synthétisés.

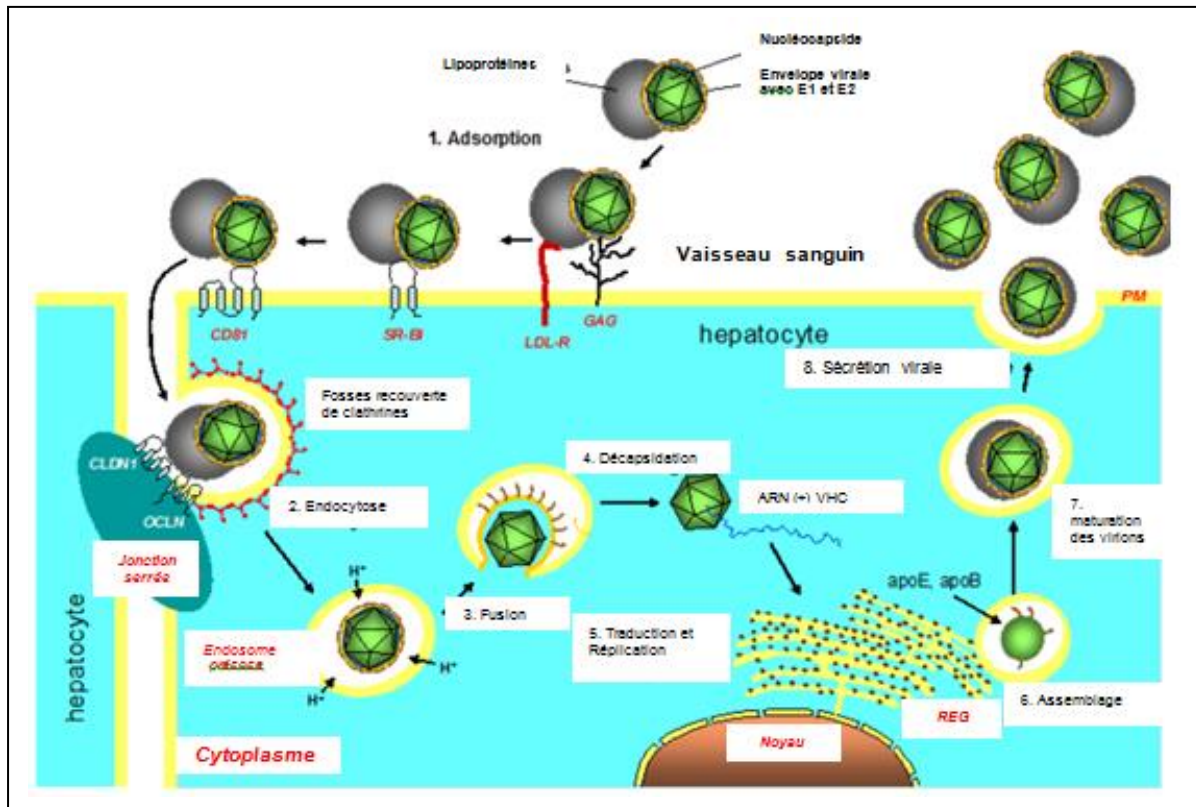


Figure 9: Cycle de vie complet du VHC (Mauss *et al.*, 2013)

1. Phase d'adsorption: Le VHC, sous sa forme circulante (lipo-viro-particule) est capté par différents facteurs non spécifiques situés à la surface cellulaire (récepteurs GAG et LDL-R). Ces facteurs permettent l'attachement du virus à la membrane cellulaire. Ensuite, la particule virale est dirigée vers des facteurs spécifiques (SR-BI et CD-81) d'entrée qui permettent l'internalisation du virus par endocytose dépendante des clathrines. 2. Endocytose: La particule virale est englobée dans une vésicule appelée endosome. Les lipoprotéines servant à son transport sont retenues par les jonctions serrées (les occludines) de l'hépatocyte adjacent. 3 et 4. Fusion et décapsidation: L'afflux de protons dans cette vésicule favorise la fusion avec la membrane de l'endosome avec l'enveloppe virale, et la libération de la nucléocapside. S'ensuit une décapsidation qui libèrera le génome viral. 5. Traduction et Réplication: L'ARN viral, ainsi libéré, se dirige vers le réticulum endoplasmique granulaire (REG) pour la synthèse des protéines virales. Les protéines non structurales, vont diriger la réplication de l'ARN viral. Elles sont enchâssées dans la membrane du réticulum endoplasmique. 6. Assemblage: elle débute au niveau des gouttelettes lipidiques situées près du REG puis continue dans le réticulum endoplasmique lisse où les apoprotéines B et E vont se greffer à la structure pour former des virions. 7 et 8. Maturation et libération: Ces virions vont continuer leur maturation dans l'appareil de Golgi où des glycosylations seront effectuées sur les protéines E1 et E2 de l'enveloppe. Puis les particules virales infectieuses seront excrétées dans le compartiment extracellulaire. Une transmission cellule à cellule est également effectuée.

I.2.2.4.1. Protéines virales et hôtes impliquées dans le processus d'entrée

La pénétration du VHC dans la cellule hôte obéit à un mécanisme complexe qui se fait en plusieurs phases (figure 10). Les virions VHC, libres ou associées à des apolipoprotéines plasmatiques interagissent en cascade avec de nombreux récepteurs présents à la surface cellulaire (**Dubuisson et Cosset, 2014**). Tout d'abord, les facteurs d'entrée non spécifiques tels que les glycosaminoglycanes (GAG) et les récepteurs LDL, situés à la surface cellulaire fixent le virus: c'est la phase d'attachement. Elle implique l'interaction des GAG avec les glycoprotéines E1 et E2 de l'enveloppe virale et l'interaction des récepteurs LDL avec les apoprotéines B et E de cette même enveloppe. Par la suite, le virus est dirigé vers des facteurs d'entrée spécifiques tels que les récepteurs cellulaires *scavenger class B site I* (SR-BI) et de la tetraspanine CD-81. L'interaction avec ces récepteurs permet le transfert du VHC au niveau des jonctions serrées: Claudine-1 (protéine des jonctions serrées), et des occludines (OCLN). C'est la phase d'internalisation. Une fois internalisé, le virus se retrouve dans l'endosome. Le faible pH dans l'endosome permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome, suivie d'une décapsidation qui libère le génome viral dans le cytosol. La multiplication virale peut ainsi commencer.

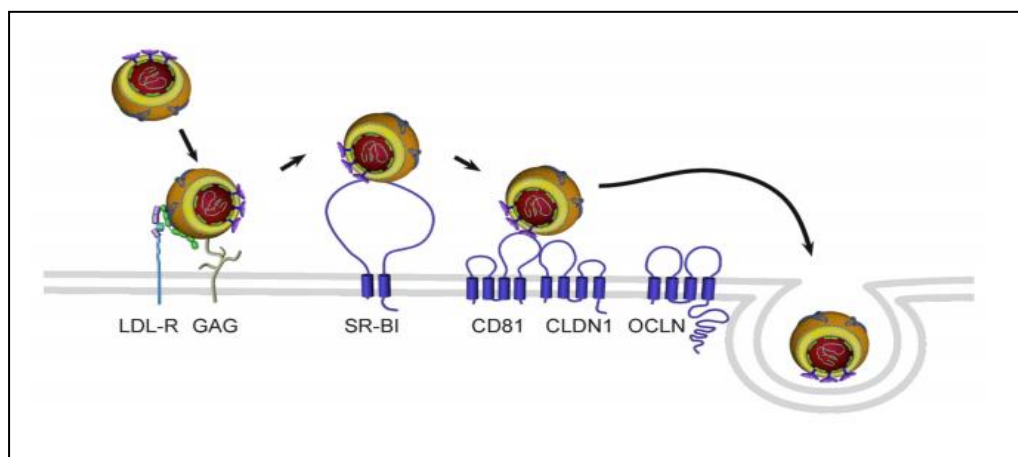


Figure 10: Mécanisme de fixation du VHC sur l'hépatocyte (Calland et al., 2012).

LDL-R: Récepteurs pour lipoprotéines de basse densité; GAG: Glycosaminoglycanes, SR-BI: scavenger receptor Class B site I. CD-81: Claudine-81; CLDN1: Claudine-1; OCLN: Occludine.

La protéine CD81 est une protéine très importante dans l'entrée du VHC. Des études ont montré que l'inhibition de cette protéine à l'aide d'ARN interférents, inhibe l'infection des cellules par le VHC. D'autres travaux ont également démontré que l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine CD81 sur les cellules hépatocytaires inhibe l'infection de ces cellules par le VHC (Belouzard *et al.*, 2011; Gottwein *et al.*, 2007).

I.2.2.4.2. Protéines virales et hôtes impliquées dans le processus de traduction et réplication de l'ARN génomique

Une fois dans le cytosol, l'ARN génomique est traduit en une poly-protéine d'environ 3000 aminoacides. Cette poly-protéine est ensuite clivée sous l'action des protéases virales et cellulaires, en 10 protéines (figure 11). Celles dérivant de la région structurale du génome forment la capsidie virale, les glycoprotéines E1 et E2 de l'enveloppe, qui jouent un rôle important dans le pouvoir infectieux du virus. Celles dérivant de la région non structurale forment les protéines NS 2, 3, 4 et 5. Sous l'effet de certains facteurs de l'hôte, les protéines NS3/4A, NS4B, NS5A, NS5B vont s'assembler, formant le complexe de réplication qui va diriger la synthèse de nouveaux ARN génomiques (Dubuisson et Cosset, 2014).

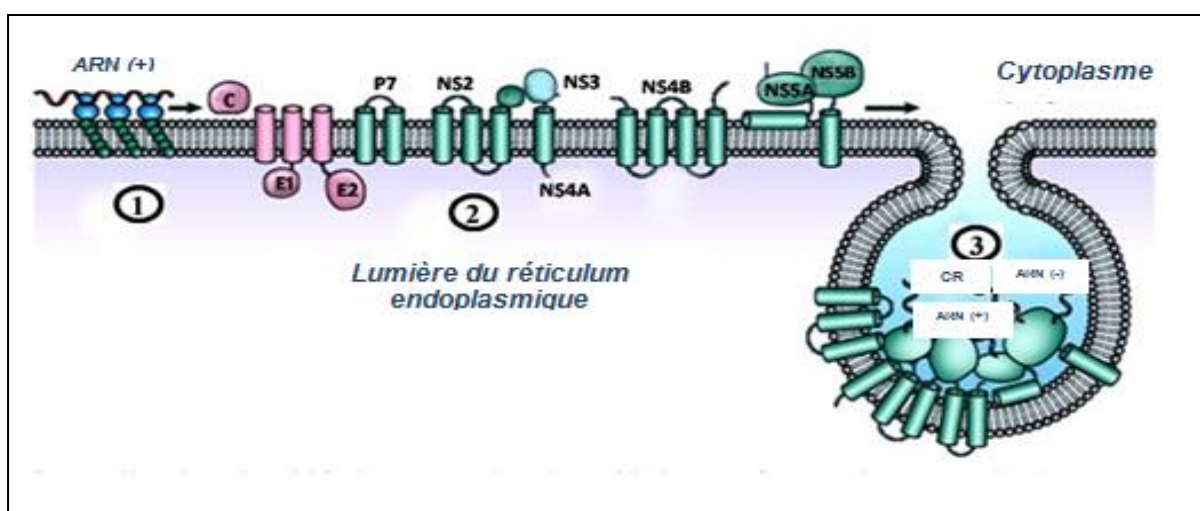


Figure 11: Mécanisme de formation du complexe de réplication du VHC dans la membrane du réticulum endoplasmique (Sarker *et al.*, 2014)

(1) L'ARN viral est traduit en une poly-protéine d'environ 3000 aminoacides. (2) Celle-ci va se cliver pour former les protéines structurales (en rose) et les protéines non structurales (en vert). (3) la NS4B

va induire une déformation membranaire au niveau du réticulum endoplasmique entraînant l'assemblage et la formation du complexe de réplication (CR). Cette déformation prend le nom de membranous web.

Au cours de la réplication, l'ARN génomique (de polarité positive) est transcrit en un ARN de polarité négative. La synthèse des brins négatifs requiert l'interaction de deux séquences situées dans la région X de l'extrémité 3'UTR de l'ARN génomique et la séquence codant la protéine NS5B. Suite à cette interaction, la protéine NS5B est recrutée et exerce son activité ARN polymérase ARN dépendante. Par la suite, les ARN négatifs formés serviront de matrice pour la synthèse de nouveaux ARN génomiques. Ceux-ci-pourront être directement encapsidés ou utilisés à nouveau pour la synthèse des protéines virales (**Sarker *et al.*, 2014**). Pour ce qui est des autres protéines, la protéine NS3 exerce une activité hélicase requise pour la réplication de l'ARN viral. La NS4A permet d'ancrer la NS3 dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE). La NS4B permet la formation des compartiments membranaires appelés *membranous web* nécessaire à la mise en place du complexe de réplication. La NS5A quant à elle se lie à l'ARN viral et à la NS5B modulant ainsi son activité enzymatique (**Pawlotsky, 2013**).

Certains facteurs de la cellule hôte jouent un rôle important dans la régulation de la réplication virale. C'est le cas notamment du facteur d'échange nucléotidique GBF-1 (*golgi-associated brefeldin A-resistant factor*) et de la protéine kinase PI4KA (*class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha*). En effet, il a été démontré que la suppression de l'expression de ces protéines ou leur inhibition pharmacologique inhibe la réplication du VHC dans les hépatocytes (**Borawsky *et al.*, 2009; Bianco *et al.*, 2012**).

Les virions néoformés vont interagir à ce niveau avec les lipoprotéines de faibles densités (VLDL) pour acquérir leur maturation puis seront libérés vers l'extérieur par la voie d'excrétion des VLDL (**Popescu et Dubuisson., 2010**). Des études ont montré que des protéines essentielles au métabolisme des lipides jouent un grand rôle dans la production virale. L'inhibition de l'Apo B par exemple ou de la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP), une protéine essentielle à la biosynthèse des VLDL inhibe la production des virions (**Huang et al., 2007**). C'est aussi le cas de la diacylglycerol acyltransférase-1 (DGAT-1), une enzyme de la synthèse des triglycérides indispensable pour le transport de la protéine core vers les gouttelettes lipidiques (**Herker et al., 2010**).

I.3. Méthodes expérimentales d'étude des hépatites

1.3.1. Modèles expérimentaux d'étude des hépatites toxiques

Plusieurs composés toxiques sont utilisés au laboratoire pour induire une hépatite *in vitro* ou *in vivo*. C'est le cas du tétrachlorure de carbone (CCl₄) ou encore de l'acétaminophène (APAP). Généralement, les animaux d'expérience sont le rat ou la souris dans le cas d'une étude *in vivo*; et les hépatocytes primaires humain, de rat ou de souris et certaines lignées cellulaires d'hépatocyte humain sont utilisés pour les études *in vitro*. Seulement, les protocoles d'utilisation de chaque substance toxique ou de chaque modèle sont diversifiés.

1.3.1.1. Induction de l'hépatite toxique *in vivo*

Une overdose d'APAP ou l'ingestion de substances toxiques telle que le CCl₄ peut entraîner aussi bien chez l'homme que chez l'animal des lésions sévères du foie parmi lesquelles la rupture de la membrane plasmique, le dysfonctionnement mitochondrial et la fragmentation de l'ADN (**McGill et al., 2012**). Avec le modèle d'hépatite induite par l'APAP,

il est administré per os aux doses de 300 mg/Kg et, 1 à 3 g/Kg de masse corporelle respectivement chez la souris et le rat. L'hépatite s'installe généralement 6 à 12 h chez la souris et 24 à 48 h chez le rat après intoxication. Quant à l'hépatite induite par le CCl₄, le toxique est généralement dissout dans l'huile de maïs ou d'olive dans les proportions 1:3 v/v et est administré par voie intra péritonéale ou sous cutané aux doses d'intoxication variant de 0,3 à 0,7 ml/Kg et, de 0,05 à 0,07 ml/Kg de masse corporelle respectivement chez le rat et la souris. L'hépatite est effective 24 h après intoxication (**Jaeschke et al., 2013**).

1.3.1.2. Induction d'hépatite toxique *in vitro*

Les modèles d'étude d'hépatites toxiques *in vitro* sont généralement les hépatocytes primaires (humain ou de souris) et les lignées cellulaires d'hépatocyte humain.

➤ Les hépatocytes primaires

Les meilleurs modèles cellulaires d'étude d'hépatite toxique en laboratoire sont les cultures d'hépatocytes primaires humains ou de souris car elles reproduisent quasi totalement la pathophysiologie *in vivo* de la plupart des toxiques utilisés pour l'induction de l'hépatite, parmi lesquels l'APAP, le cisplatine et le CCl₄ (**Ni et al., 2012; Xie et al., 2014**). Cependant, à cause du fait que les hépatocytes fraîchement isolés perdent rapidement l'activité des enzymes du cytochrome P450 (enzymes responsable de l'activation métabolique des différents toxiques), il est nécessaire de commencer les expériences immédiatement après l'isolement et la mise en culture des hépatocytes. En effet, un délai significatif, par exemple une culture pendant une nuit, réduit la sensibilité des hépatocytes et augmente le risque d'introduction d'un mécanisme de toxicité inapproprié (**Jaeschke et al., 2013**). Pour résoudre ce problème, les lignées cellulaires d'hépatocytes humains ont été développées.

➤ **Les lignées cellulaires d'hépatocyte humain**

Comparativement aux hépatocytes primaires, certaines lignées cellulaires d'hépatocytes humains, telles que les cellules d'hépatome humain: HepG3, Hep3G, Huh7, HC04... ne sont pas des modèles appropriés pour l'étude des hépatites toxiques, à cause du faible niveau d'expression des enzymes du cytochrome P450 dans ces cellules (**Lin et al., 2012**). Ceci ne signifie pour autant pas qu'il n'y a pas de toxicité dans ces cellules, mais il n'y a pas activation métabolique du toxique et le type de mort cellulaire est généralement l'apoptose (**Kass et al., 2003; Manov et al., 2004; Lin et al., 2012**). Par conséquent, le mécanisme de toxicité dans les lignées cellulaires d'hépatome humain n'est pas approprié pour l'étude des processus pathologiques de divers toxiques chez l'homme.

Cependant, une exception à cette règle est la lignée cellulaire dénommée « L-02 » métaboliquement compétent. En effet, les cellules L-02 dérivent directement des hépatocytes d'adulte humain sain. Tout comme les hépatocytes primaires humains ou de souris, les cellules L-02 ont un niveau d'activité du cytochrome P450 comparable à celui de ces dernières; et présentent l'avantage de reproduire les principaux mécanismes de toxicité de divers toxiques à savoir: l'activation métabolique du toxique, la déplétion du glutathion, la peroxydation lipidique membranaire, le dysfonctionnement mitochondrial et la mort cellulaire par nécrose (**Pang et al., 2016; Jin et al., 2015; McGill et al., 2011**).

Toute-fois, quelles que soient les modèles cellulaires, une étude dose-réponse du toxique utilisé pour l'induction de l'hépatite en fonction de la densité des cellules doit être faite afin d'établir les conditions expérimentales adéquates permettant d'étudier les mécanismes de toxicité dudit toxique. L'hépatotoxicité de ces composés est généralement mise en évidence par une élévation du taux de transaminases sériques, une baisse du taux de

glutathion dans le foie et une formation massive du malondialdéhyde (MDA), un produit terminal de la peroxydation des lipides membranaires (**Jaeschke et al., 2013**).

1.3.2. Modèles expérimentaux d'étude du VHC

Suite à la découverte du VHC en 1989, plusieurs modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* ont été mis sur pied afin d'explorer différents aspects de l'infection virale. S'agissant des modèles d'étude *in vitro*, différents systèmes ont été développés afin d'étudier efficacement les étapes clés du cycle viral que sont: l'entrée, la réplication, l'assemblage et la libération des virions. Il s'agit entre autres: des réplicons subgénomiques, des pseudo-particules rétrovirales (VHCpp) et des particules virales infectieuses produites en culture cellulaire (VHCcc). Par ailleurs, ces systèmes représentent des outils importants pour l'identification de nouveaux agents inhibiteurs du VHC. Cependant, ils sont limités par le type cellulaire et les souches virales qui peuvent être étudiés. Quant aux modèles d'étude *in vivo*, plusieurs modèles animaux sont aujourd'hui utilisés. Ils vont du modèle chimpanzé aux souris dites « humanisées », plus accessibles.

1.3.2.1. Modèles d'étude du VHC *in vitro*

➤ Les réplicons subgénomiques

Par définition, les réplicons subgénomiques sont des molécules d'ARN capables d'auto-amplification. Dans le cas du VHC, il s'agit d'ARN chimériques capables de répliquer une partie du génome viral. Ils ont été développés pour la première fois par **Lohman et al. (1999)** à partir d'un isolat viral du VHC de génotype 1b (isolat Con1).

Les réplicons subgénomiques du VHC sont construits en enlevant du génome viral les gènes structuraux, p7 et parfois NS2; puis en insérant à l'extrémité 5' non codante, un marqueur de sélection qui est un gène de résistance à la néomycine (un antibiotique encore

appelé G418). Ce gène qui est celui de la néomycine phosphotransférase ou *neo* est sous la dépendance de l'IRES (*internal ribosomal entry site*) du VHC. A l'extrémité 3' du gène *neo*, on insère l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) qui contrôle l'expression des gènes non structuraux du VHC (NS3-NS5B). Une fois les réplicons construits, on les introduit dans les cellules Huh-7 (lignées humaines d'hépatocytes cancéreux, hautement permissives au VHC) par transfection. On obtient alors 3 types de cellules: des cellules sans réplicons, des cellules avec des réplicons incapables de s'auto-amplifier et des cellules avec des réplicons capables d'auto-amplification. Seules les cellules Huh-7 capables de supporter la réplication des ARN subgénomiques transfectés vont se multiplier sur milieu G418 et pourront ainsi être utilisées (figure 13) (Steimann et pietschman, 2013).

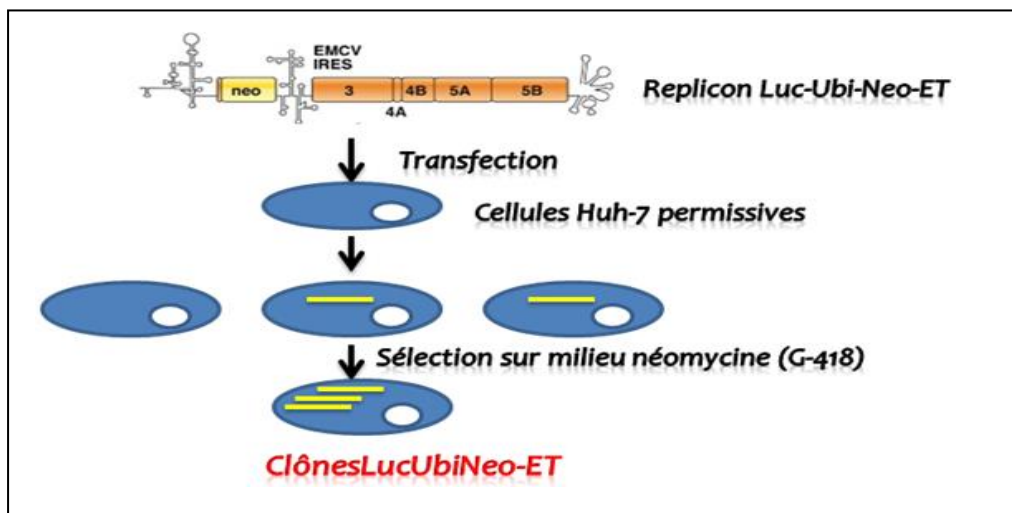


Figure 13: Le système réplicon subgénomique du VHC (Steimann et pietschman, 2013)

Après l'introduction des systèmes réplicons en 1999, d'autres réplicons subgénomiques ont été développés (figure 14). C'est le cas par exemple des réplicons subgénomiques contenant des gènes rapporteurs comme le gène de la luciférase (Frese *et al.*, 2002), des protéines fluorescentes comme la *green fluorescent protein* (GFP) ou de la β -lactamase (Steimann et pietschmann, 2013). L'utilisation de ces gènes rapporteurs a facilité l'exploration des mécanismes de réplication du VHC.

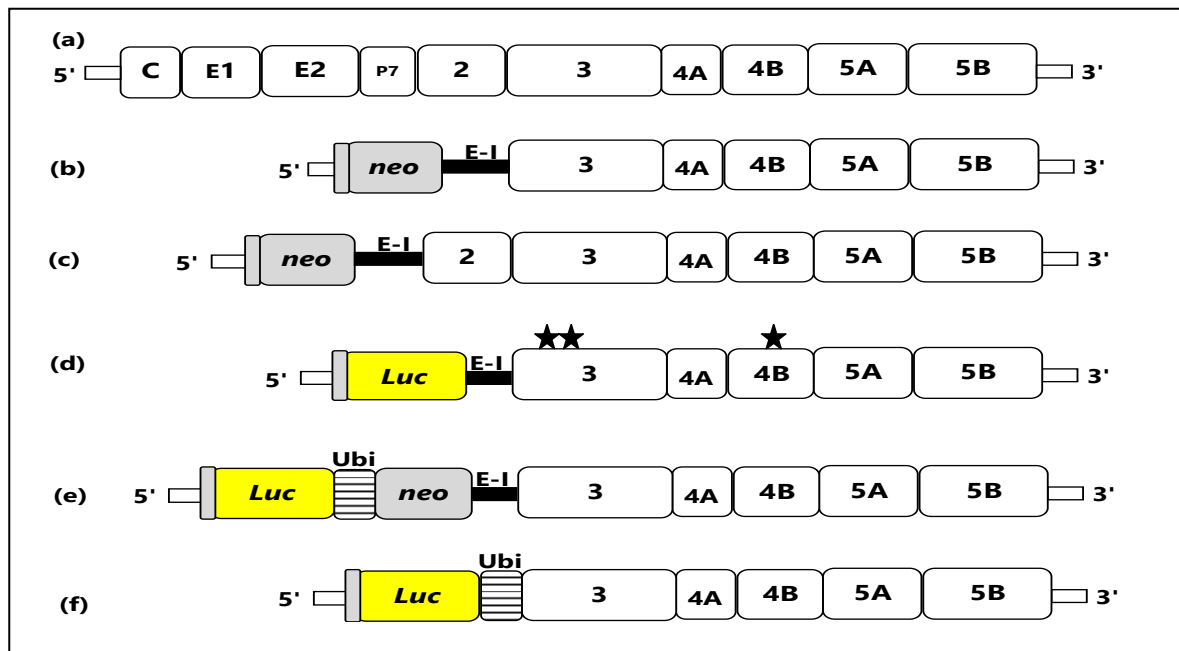


Figure 14: Quelques exemples de réplicons subgénomiques du VHC (Woerz *et al.*, 2009)

(a) Représentation schématique du génome du VHC. Les extrémités 5' et 3' NTR sont indiquées par des petites barres horizontales blanches. (b) et (c) Structures des réplicons subgénomiques bicistroniques sélectionnables sur milieu antibiotique (néomycine). Ils sont composés de la région 5' NTR dirigeant la traduction du gène *neo*, de l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (E-I) qui dirige la traduction des gènes NS3-NS5B (b) ou NS2-NS5B (c). (d) Structure d'un réplicon subgénomique *Con1* rapporteur. Il s'agit d'un réplicon bicistronique porteur du gène de la luciférase (*Luc*) et qui contient 3 mutations adaptatives indiquées par des étoiles noires. (e) Structure d'un réplicon subgénomique rapporteur sélectionnable sur milieu antibiotique. Ce réplicon code pour l'expression d'une protéine fusion: la luciférase-ubiquitin-neomycine phosphotransférase dans le premier cistron. L'ubiquitine est utilisée pour provoquer la séparation protéolytique de la neomycine phosphotransférase de la protéine fusion. (f) Structure d'un réplicon subgénomique monocistronique rapporteur. Le gène de la luciférase est fusionné via l'ubiquitine à l'ensemble des gènes de réplication du virus (NS3-5B).

➤ Les pseudo-particules du VHC (VHCpp)

En absence de modèles permettant d'étudier le cycle viral complet du VHC, des modèles alternatifs ont été mis sur pied. Les VHCpp sont le premier système infectieux *in vitro* développé pour investiguer l'entrée du VHC. Il s'agit de particules rétrovirales non-répliquatives contenant un gène rapporteur et exprimant à leur surface des glycoprotéines E1 et E2 du VHC sous forme d'hétéro-dimères (Bartosch *et al.*, 2003). L'avantage de ce système est qu'il permet d'étudier les événements liés à l'entrée du VHC sans se soucier des étapes de réplication ou d'assemblage. De plus, il offre la possibilité d'étudier l'entrée du VHC dans les

systèmes cellulaires qui ne sont pas permissifs à la réplication de l'ARN subgénomique (Steinmann et pietschmann, 2013).

➤ **Le système VHCcc ou particules virales infectieuses produites en culture cellulaire**

Malgré les progrès réalisés avec les systèmes réplicons, le manque de production de virions en culture cellulaire était un inconvénient majeur. Ceci à cause des mutations adaptatives qui bloquent l'assemblage viral. Cet inconvénient va être dépassé avec l'identification d'un isolat viral d'origine asiatique capable de générer des virions infectieux. En effet, en 2001, une souche du VHC de génotype 2a a été isolée chez un patient japonais atteint d'hépatite fulminante. Cette souche a été baptisée clone *Japanese fulminant hepatitis-1* (JFH-1) et utilisée pour la construction d'un ARN subgénomique (Kato *et al.*, 2003). Des essais en culture cellulaire vont montrer que cet ARN subgénomique de JFH-1 se réplique efficacement dans les cellules de la lignée Huh-7 (Kato *et al.*, 2005). En 2005, trois équipes de chercheurs ont tenté directement d'électroporer les cellules Huh-7 avec de l'ARN génomique du clone JFH-1. Les résultats de leurs travaux ont montré que cette électroporation entraînait la production de particules virales infectieuses capables de coloniser des hépatocytes naïfs, d'où la naissance du modèle VHCcc (Lindenbach *et al.*, 2005; wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005).

Des améliorations ont été opérées par la suite sur ce modèle afin d'augmenter la production des particules VHCcc. C'est ainsi que des ARN chimériques intra- et inter-génotypiques ont été développés (figure 15). Ces chimères ont été conçues en remplaçant les séquences core à NS2 de JFH-1 par celles d'autres isolats de mêmes génotypes ou de génotypes différents. De plus, afin de faciliter la détection des cellules infectées et de quantifier le niveau d'infection, des clones JFH-1 exprimant un gène rapporteur comme la

GFP ou la luciférase ont été développés (vieyres and pietschmann, 2013). L'avantage de ce modèle est qu'il permet désormais d'étudier chaque étape du cycle viral complet du VHC. Il a permis de réaliser des progrès dans la compréhension des étapes d'assemblage et de sécrétion, de compléter et/ou confirmer les résultats obtenus avec les autres systèmes d'étude sur l'étape d'entrée et le rôle des récepteurs cellulaires impliqués dans cette étape.

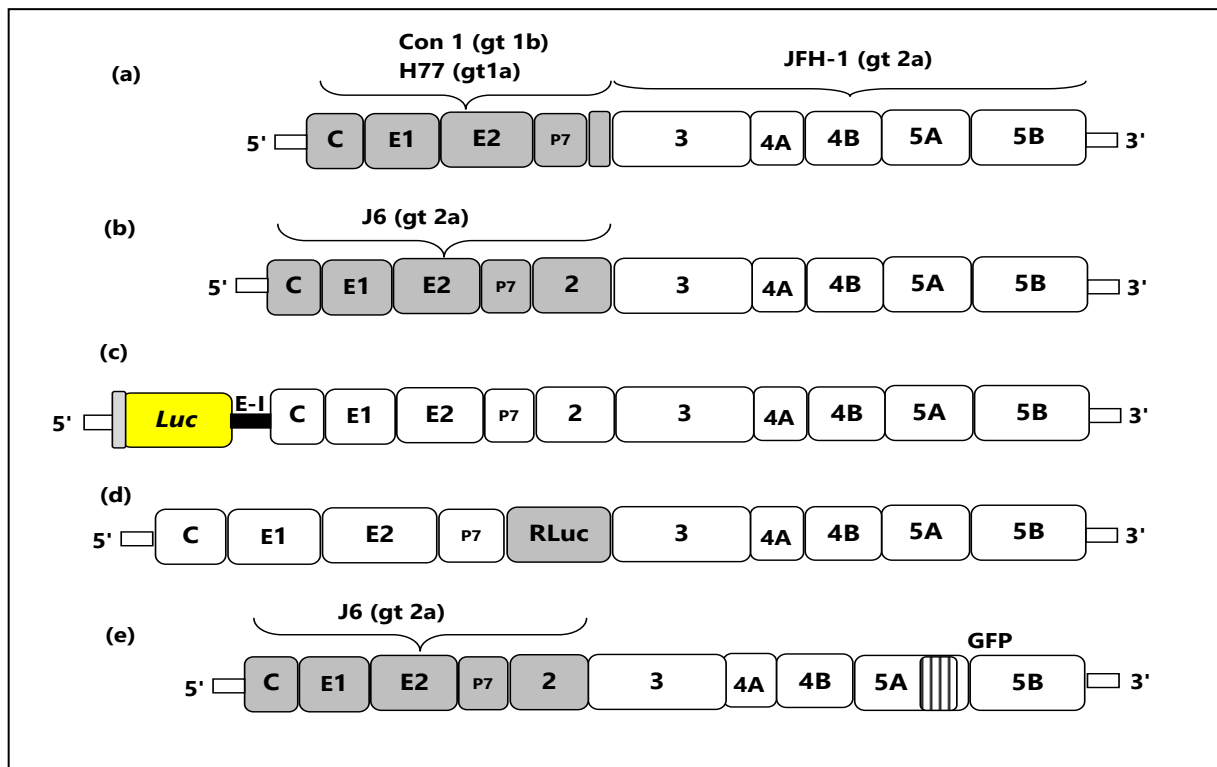


Figure 15: structure de quelques génomes dérivés de JFH-1 (woerz et al., 2009)

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

1.3.2.2. Modèles d'étude du VHC *in vivo*

➤ Le modèle chimpanzé

Les chimpanzés restent le meilleur modèle animal pour l'étude complète de l'infection au VHC, de la pathogénèse de ce virus et de la réponse immunitaire adaptative et innée y associées. Ils reproduisent en effet de manière quasi-identique l'hépatite C retrouvée chez l'Homme (**Catanese et Dorner, 2015**). Cependant, l'utilisation de ce modèle est limitée par plusieurs facteurs notamment les considérations éthiques qui estiment que l'Homme et le chimpanzé ne présentent qu'environ 2% de divergence génétique; ou encore la classification des chimpanzés comme espèces en voie de disparition et menacées d'extinction. A cause de tous ces facteurs, de petits modèles animaux ont été développés comme alternative au modèle chimpanzé.

➤ Les souris humanisées uPA/SCID

Ce modèle a été développé en 2001 par **Mercer *et al.* (2001)**. C'est l'un des modèles animaux les plus innovants qui existent à ce jour dans la recherche sur le VHC. Les souris uPA/SCID sont en fait des souris atteintes d'une immunodéficiences combinée sévère (ou souris *SCID*) et dont le foie a été transplanté par injection d'hépatocytes humains. Ces souris SCID portent un transgène (*urokinase-type plasminogen activator* ou uPA gene) dont la surexpression provoque la dégénérescence des hépatocytes murins et le greffage des hépatocytes transplantés. Les souris uPA/SCID peuvent être infectées avec un sérum VHC-positif et donner une charge virale avec une augmentation logarithmique de 5 à 7 fois le témoin. Bien que ces souris ne puissent pas être utilisées pour des études liées à la réponse immunitaire, ils sont utilisés pour examiner la pathogénèse du VHC *in vivo* et comme modèle pour le criblage des composés antiviraux (**Bukh, 2012**).

I.4. Thérapies contre les hépatites

I.4.1. Approche moderne

I.4.1.1. Traitement des hépatites toxiques

En général, s'agissant des hépatites médicamenteuses ou toxiques, le traitement peut consister en l'arrêt de la prise du médicament ou de l'exposition au toxique en cause. Cet arrêt entraîne une amélioration progressive en ce qui concerne les formes mineures. Pour les formes majeures, de nombreuses tentatives thérapeutiques sont entreprises en fonction des symptômes. Ainsi, les corticoïdes sont administrés à la dose journalière de 20 à 30 mg et réduite de 5 mg tous les 8 à 15 jours, jusqu'à la dose minimale nécessaire pour obtenir une normalisation des transaminases sériques. Dans les cas d'intoxications sévères au paracétamol ou au tétrachlorure de carbone, le N-acétyl-cystéine, un précurseur du glutathion cellulaire est généralement administré par voie orale ou intraveineuse. Cependant, il présente l'inconvénient qu'il doit être administré dans les 8 h qui suivent l'intoxication (**Bebarta *et al.*, 2010**). En somme, le traitement consiste en une administration des produits ayant une action généralement détoxiquante.

I.4.1.2. Traitement de l'hépatite virale C

Le traitement de l'hépatite C s'est considérablement amélioré depuis son identification en 1989. On est passé de l'interféron alpha (IFN α) utilisé en monothérapie au début des années 90, à l'association IFN α et ribavirine (RBV) au courant des années 90, puis à l'IFN α pegylée (PEG- IFN α)/RBV à partir des années 2000 et qui sera utilisée comme traitement standard jusqu'en 2010. En 2011, l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) a autorisé la mise sur le marché de deux nouvelles molécules pour soutenir la bithérapie standard. Il s'agit en fait des agents antiviraux qui ont une action directe

sur le virus et sont dénommés *Direct acting antiviral agents* (DAAs) (**CADTH Rapid Response reports, 2014**).

I.4.1.2.1. De l'interféron alpha à la bithérapie standard

L'interféron (IFN) est une protéine de la famille des cytokines qui, exprimée par les cellules à la suite d'une infection virale, induit un état de résistance antiviral à l'infection (**Pestka et al., 2004**). Trois classes d'IFN ont été identifiées, désignées de type I à III, et classées en fonction du récepteur par lequel ces protéines se fixent. On distingue ainsi:

- Les IFN de type 1 qui regroupent: IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω et IFN- ν . Ces interférons se fixent tous sur le récepteur *Interferon alpha/beta receptor* (IFNAR).
- Les IFN de type 2 qui regroupent seulement l'IFN γ qui lui se fixe sur un récepteur discret appelé *interferon gamma receptor* (IFNGR)
- Les IFN de type 3 qui rassemblent les IFN- λ 1, IFN- λ 2 et IFN- λ 3 encore appelés interleukines IL-29, IL-28A et IL-28B se fixent sur le récepteur *interferon lambda receptor* (IFNLR).

Comme présenté sur la figure 16 ci-après, l'IFN α agit en se fixant sur son récepteur membranaire (IFNAR) situé à la surface des hépatocytes. Cette fixation active une cascade de phosphorylation intracellulaire médiée par la voie Jak/Stat. Les protéines STAT-1 et STAT-2 phosphorylées vont s'associer à la protéine *Interferon regulated factor-9* (IRF-9) pour former le facteur de transcription *Interferon stimulated gene factor-3* (ISGF-3). Ce facteur va migrer dans le noyau et se fixer sur le promoteur *Interferon stimulated response element* (ISRE) activant ainsi l'expression des ISGs (*Interferons stimulated genes*) qui ont des activités antivirales par dégradation du génome virale. Les ISGs regroupent plus de 300 gènes dont les

plus connus jusqu'ici sont les protéines myorédoxines (Mx), la protéine kinase R (PKR) et la 2',5'-oligoadenylate synthétase-3 (OAS-3) (Pestka *et al.*, 2004).

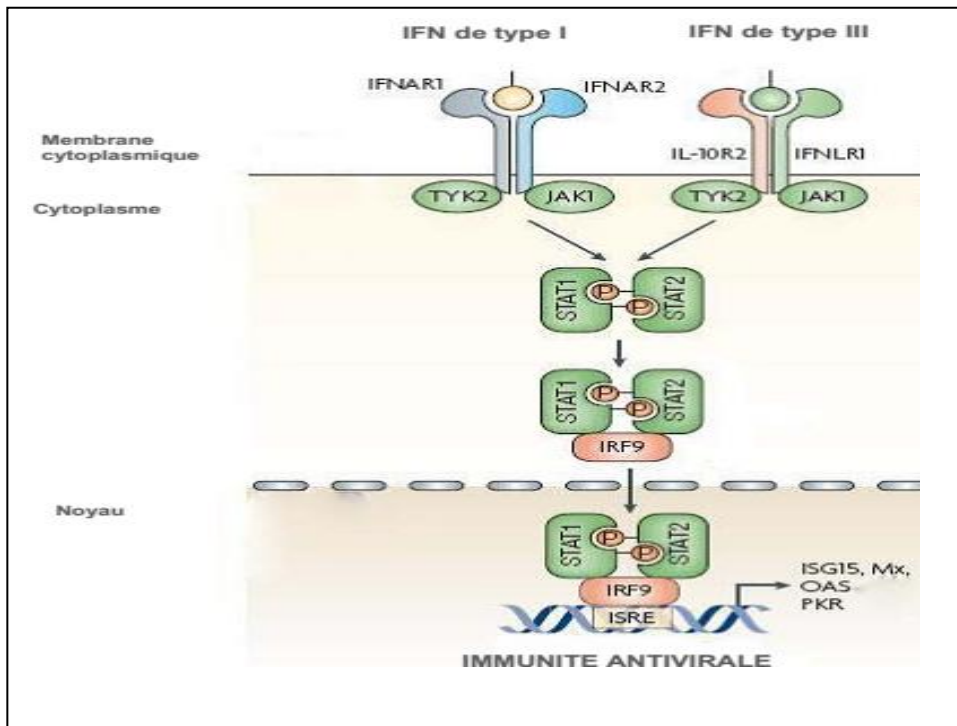


Figure 16: Voie de signalisation des interférons de type I et III (Pestka *et al.*, 2004)

IFNAR1 et IFNAR2: Interferon alpha-1 and 2 receptor; IFNLR1: interferon lambda receptor-1; IL-10R2: Interleukine-10 receptor; IRF-9: Interferon regulated factor-9; ISRE: Interferon stimulated response element; PKR: protéine kinase R; OAS: 2'5' oligoadénylate synthétase. Mx: Myorédoxines.

L'un des problèmes liés à l'utilisation l'IFN α est sa faible stabilité dans le sang qui nécessite une administration régulière. C'est ainsi que l'IFN α est conjuguée au polyéthylène glycol (PEG) pour former l'IFN α -pegylée ou PEG-IFN α qui, associé à la ribavirine a une meilleure efficacité et une demi-vie plasmatique plus longue. Cependant, son utilisation n'est efficace que chez moins de 40 % des patients traités et est également associée à de nombreux effets secondaires comme la dépression (Schaefer et Mauss, 2008; Sarrazin, 2010; Mauss *et al.*, 2013).

I.4.1.2.2. Utilisation des agents antiviraux à action directes (DAAs)

Par définition, les DAAs ou *Direct-acting antiviral agents* sont des agents antiviraux qui ont une cible directe sur le virus. Aujourd'hui, la recherche pharmacologique contre l'hépatite C est de plus en plus tournée vers les DAAs. Ces agents ciblant pour la plupart les protéines non-structurales du complexe de réplication, sont plus efficaces et mieux tolérés par les patients (**Palowtsky, 2013**). On distingue en effet: des inhibiteurs de protéase virale NS3/NS4A, des inhibiteurs de la protéine NS5A, des inhibiteurs de polymérase virale NS5B. La figure 17 ci-dessous présente la structure de quelques DAAs approuvés par la FDA.

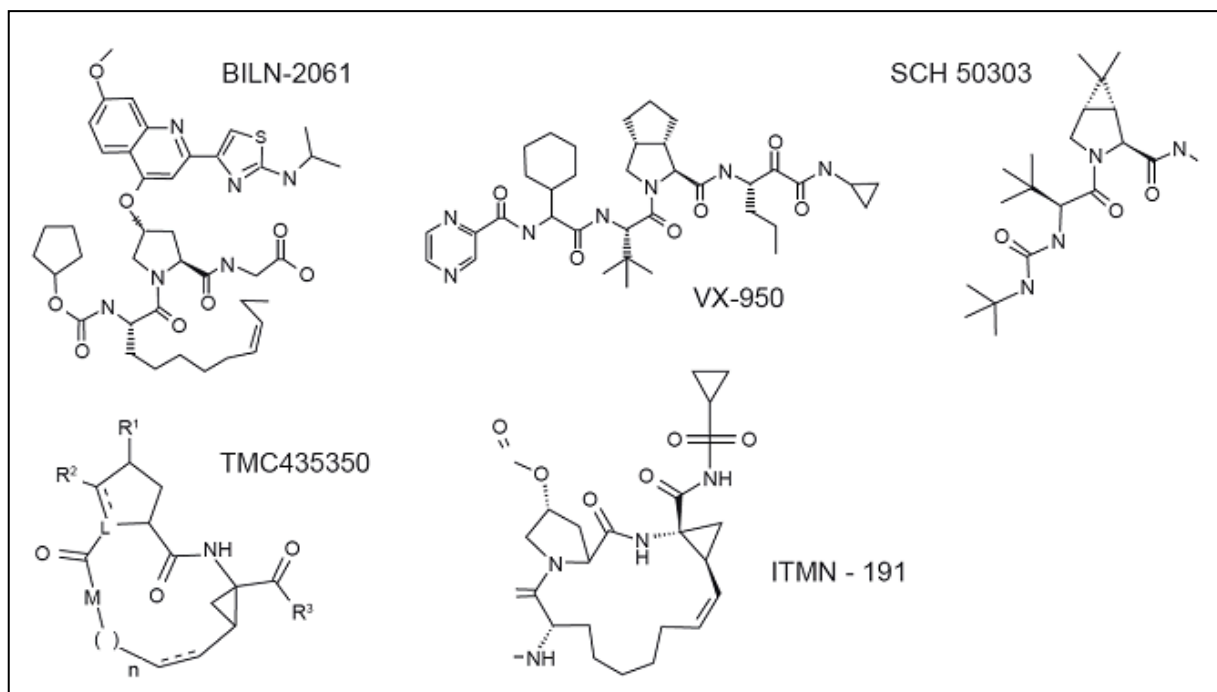


Figure 17: Structure moléculaire de quelques DAAs

BILN-2061 ou *Ciluprevir* inhibiteur de la NS5A; *VX-950* ou *Telaprevir* et *SCH 50303* ou *Boceprevir* inhibiteur de la NS3/NS4A; *TMC435350* ou *Simeprevir* inhibiteur de la NS5B.

A ce jour, ces inhibiteurs sont hautement efficaces mais présentent tous les mêmes problèmes: leurs coûts onéreux (par exemple entre 348 000 et 450 000 FCFA/mois pour un traitement de 3 mois); développement des mutations et de résistances, à cause de leur

mécanisme d'action ciblant uniquement les protéines virales comme cela a été le cas avec les premiers DAAs, (le boceprevir et le telaprevir) inhibiteurs de la protéase NS3/NS4A (sarrazin, 2010; Mauss *et al.*, 2013).

I.4.2. Plantes médicinales et hépatites

Malgré les efforts déployés par les firmes pharmaceutiques pour mettre sur pied de nouveaux traitements toujours plus efficaces contre les hépatites, il n'y a toujours pas de médicaments qui offrent une protection complète de l'organe ou qui aide à la régénération des cellules hépatiques. Ainsi, la recherche de nouvelles substances à partir des plantes médicinales est une piste prometteuse pouvant améliorer le paysage thérapeutique.

I.4.2.1. Plantes médicinales et hépatites toxiques

Les plantes sont aujourd'hui très utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des affections hépatiques. Les tableaux 2 et 3 ci-après nous présentent respectivement quelques-unes de ces plantes et leurs principes actifs dont leur pouvoir anti-hépatotoxique a été démontré expérimentalement.

I.4.2.2. Activités anti-VHC des extraits de plantes et de leurs métabolites secondaires

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

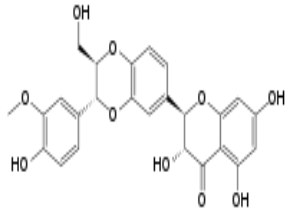
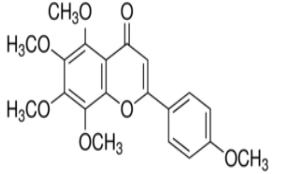
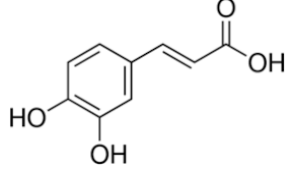
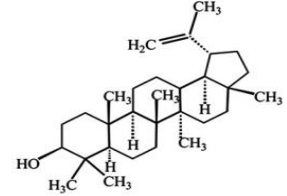
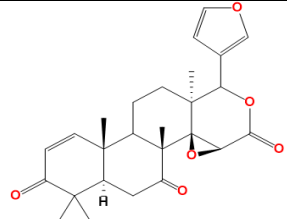
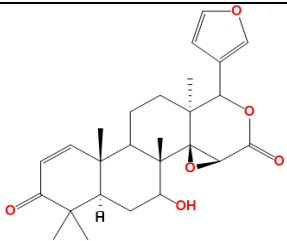
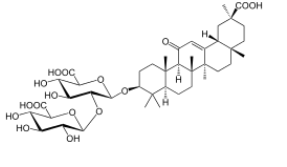
Phragmanthera capita (Loranthaceae) et *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) avec des CI_{50} respectifs de 16,16; 1,42; 13, 17 et 2,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a été démontrée (Galani *et al.*, 2015 ; Galani *et al.*, 2016).

Tableau 2 : Quelques plantes médicinales ayant des propriétés antihépatotoxiques

Espèces	Familles	Modèles expérimentaux	Toxiques	Paramètres modulés	référence
<i>Lycium barbarum</i>	Solanaceae	Souris (<i>in vivo</i>)	CCl_4	CYP2E1, ALAT, SOD, CAT	Xiao <i>et al.</i> , 2012b
<i>Rosa laevigata</i>	Rosaceae	Souris (<i>in vivo</i>)	APAP	CYP2E1, ALAT, ASAT, SOD, GSH	Liu <i>et al.</i> , 2011
<i>Silybum marianum</i>	Asteraceae	Rat et Souris (<i>in vivo</i>)	APAP CCl_4 Cisplatine	ALAT, ASAT, SOD, CAT, GSH, MDA, LDH	Madrigal-S <i>et al.</i> , 2014
<i>Rhinacanthus nasuta</i>	Leguminosae	Rat et souris (<i>in vivo</i>)	AFB-1	ALAT, ASAT, GSH	Shyamal <i>et al.</i> , 2010
<i>Khaya grandifoliola</i>	Meliaceae	Rat et souris (<i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>)	APAP, CCl_4 ,	Nrf2, ALAT, ASAT, LDH	Njyou <i>et al.</i> , 2013; Njyou <i>et al.</i> , 2015;
<i>Entada africana</i>	Mimosaceae	Cellule HC04	H_2O_2	GSH, MDA, SOD, CAT,	Njyou <i>et al.</i> , 2016

ALAT: alanine aminotransférase; ASAT: Aspartate aminotransférase; APAP: acétaminophène; CCl_4 : tétrachlorure de carbone; GSH: glutathion; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; LDH: lactate déshydrogénase; MDA: malonedialdehyde; Nrf2: Nuclear factor erythroid-2 related factor-2 ; CYP2E1: Cytochrome P450 2E1

Tableau 3: Noms et structures de quelques métabolites secondaires antihépatotoxiques

Groupes chimiques	Noms	Structures	Toxiques, modèles expérimentaux	Paramètres modulés	références
Flavonoïdes et composés phénoliques	Silibinine		CCl ₄ , souris (<i>in vivo</i>)	ALAT, ASAT, SOD, CAT, GSH, MDA, LDH	Madrigal-S et al., 2014
	Tangeretin		Cisplatine, rats, (<i>in vivo</i>)	JNK, ALAT, ASAT, MDA	Omar et al., 2016
	Acide caféique		APAP, cellule L-02 (<i>in vitro</i>) souris (<i>in vivo</i>)	CYP2E1, Nrf2, ALAT, ASAT, SOD, CAT, MDA,	Pang et al., 2016
Terpénoïdes	Lupeol		APAP, rats, (<i>in vivo</i>)	Bax, Cyt c, capase 3 et 9, ALAT, ASAT, GSH	Kumari et Kakkar, 2012a
	7-oxogedunin		D-galactosamine, souris, (<i>in vivo</i>)	ALAT, ASAT, MDA, SOD, CAT,	Ninomiya et al., 2016
	7-deacetoxy-7-oxogedunin				
Saponine	Acide glycyrrhizique		CCl ₄ , souris (<i>in vivo</i>)	Nrf2, ALAT, SOD, CAT, MDA, GSH	Chen et al., 2013

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

Toutes ces études et bien d'autres qui décrivent les activités des plantes médicinales ont permis de cribler celles ayant un fort potentiel anti-VHC et d'isoler des phytoconstitués. Le tableau 4 ci-dessous rapporte quelques-uns de ces composés cités dans la littérature comme de bons agents anti-VHC.

Tableau 4: Noms, structures et protéines cibles de quelques métabolites secondaires des plantes actifs contre le VHC

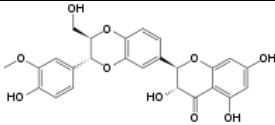
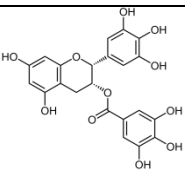
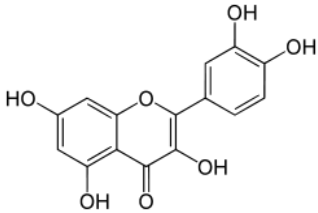
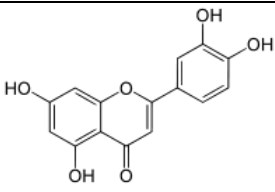
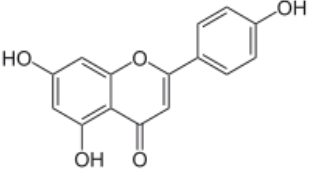
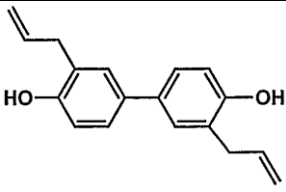
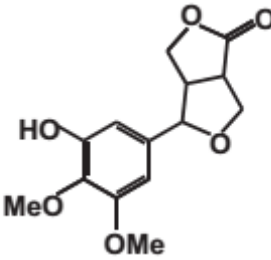
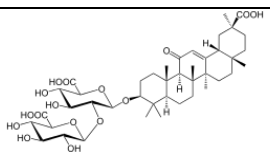
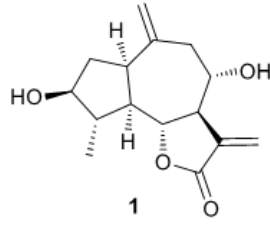
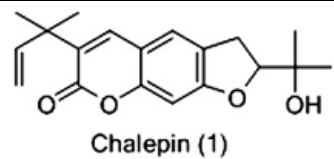
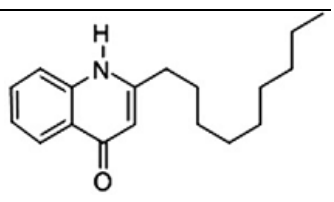
Groupe chimique	Noms	Structure	Étapes inhibées	Protéines cibles	Références
Flavonoïdes	Silibinine		Réplication	NS5B	Wagoner et al., 2010
	Epigallocatecine-3-gallate (EGCG)		Entrée (Attachement)	Glycoprotéines E1 et E2	Calland et al., 2012
	Quercétine		Réplication et assemblage	IRES, NS3	Gonzalez et al., 2009
	Lutéoline		Réplication	NS5B	Liu et al., 2015
	Apigénine				
Lignanes	Honokiol		Entrée Réplication	Glycoprotéine virale E1 et E2 NS3, NS5A et NS5B	Lan et al., 2012

Tableau 4 (suite et fin): Noms, structures et protéines cibles de quelques métabolites secondaires des plantes actifs contre le VHC

Groupe chimique	Noms	Structure	Etapes inhibées	Protéines cibles	Références
Lignanes	3-Hydroxy-carulignane		Réplication	Polyprotéine virale, Induction des OAS1-3	Wu et al., 2012
Saponines	Acide glycyrrhizique		Libération des particules virales	Core et phospho-lipase A2	Matsumoto et al., 2013
Sesquiterpènes lactones	Grosheimol		Entrée (Attachement viral)		Elsebai et al., 2015
Coumarines	Chalepine		Entrée (endocytose et fusion)	-NS3	Wahyuni et al., 2014
	Pseudane IX		Réplication virale		

NS : protéines non structurales du VHC; IRES: Internal ribosomal entry site; OAS1-3: 2',5'-oligoadenylate synthase-1 à 3.

I.5. Présentation de la plante médicinale investiguée et des travaux antérieurs

Khaya grandifoliola C.DC est une plante de la famille des méliaceae, communément appelée Acajou d'Afrique ou Acajou à larges feuilles (**Hutchinson et Dalziel, 1978**). Dans le Nord-Cameroun, la plante est connue sous le nom de *Daléhi* en langue *fulfulde*. Dans l'Ouest-Cameroun, elle est connue sous le nom de *de fa'tùtù* en langue Bamoun. Elle est largement

répandue en Afrique de l'Ouest, de la côte guinéenne au Cameroun et s'étend à certains pays de l'Afrique de l'Est à travers le bassin du Congo, l'Uganda et certaines parties du Soudan.

C'est un arbre habituellement caducifolié (qui perd ses feuilles) pouvant atteindre jusqu'à 40 m de haut sur 120-200 cm de large avec une circonférence de 5 m. Il pousse généralement dans des forêts semi-décidues de type sec ou dans des savanes (à proximité des cours d'eau et dans des localités bénéficiant d'une pluviométrie de 1200-1800 mm d'eau/an). L'arbre est remarquable par ses larges feuilles qui possèdent 3 à 4 paires de feuillettes. Ses écorces crevassées sont de saveur amère et caractérisées par une couleur brun-grisâtre à la surface. L'écorce interne par contre est de couleur rose foncée (figure 18). Elle représente la partie de la plante la plus utilisée en médecine traditionnelle.



Figure 18: Photographie de *Khaya grandifoliola* C.DC

A: vue de l'arbre depuis le sol. **B:** Coupe transversale de l'écorce de tronc. **C:** Aspect des feuilles, fruits et graines. **D:** coque d'acajou.

Au Nigéria et dans bien d'autres pays où elle est retrouvée, *K. grandifoliola* est largement utilisée contre le paludisme (**Odugbemi et al., 2007**). Les décoctions d'écorce servent à lutter contre l'ulcère gastrique et les maladies de la peau. L'infusion d'écorces est utilisée pour soigner la diarrhée due aux parasites intestinaux. La décoction de l'écorce de racines permet de soigner la gonococcie (**Olowokudejo et al., 2007**). Au Cameroun, on l'utilise également contre la jaunisse et autres troubles du foie (**Moundipa et al., 2004**). Des études antérieures sur cette plante ont rapporté des activités antipaludiques (**Makinde et al., 2006**), anti-bactériennes (**Stephen et al., 2009**), antiulcéreuses (**Njifutie et Njikam, 2006**), antianémiques, anti-inflammatoires (**Falodum et al., 2009; Owona, 2013**), hypoglycémiques et hypocholestérolémiantes (**Bumah et al., 2005**), antifongiques (**Onifade, 2006**) et antimutagènes (**Hashem et al., 2013**). Les études phytochimiques ont rapporté l'isolement et la caractérisation de 11 limonoïdes dont la grandifotane A, la méthylangolensate, la gedunine, la 7-deacetylkhivorine, la 1-deacetylkhivorine et la 6-acétylswietenolide présentant des activités antiplasmodiales *in vitro* sur *Plasmodium falciparum* (**Bickii et al., 2000; Yuan et al., 2010**). De récentes études par ailleurs, ont démontré que l'extrait des écorces avec le mélange chlorure de méthylène/méthanol (1:1, v/v) possède de fortes propriétés anti-hépatotoxiques et antivirale contre le virus de l'hépatite C (VHC) et une fraction très active de cet extrait nommée « KgF25 » capable d'activer le système antioxydant cellulaire et d'inhiber les étapes clés (entrée, réplication et assemblage/libération) du cycle infectieux du VHC a été isolée (**Njayou et al., 2015; Njayou et al., 2016 ; Galani et al., 2016**). Cependant, aucune étude démontrant les mécanismes moléculaires des propriétés anti-hépatotoxiques et anti-VHC des constituants actifs de ladite fraction n'a encore été menée à notre connaissance.



CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

Les écorces de tronc de *K. grandifoliola* ont été récoltées en Juin 2015 dans la localité de Foumban (Département du Noun) à l'Ouest Cameroun. L'identification de la plante a été faite à partir des feuilles et des graines par Mr Nana Victor, Taxonomiste des plantes, à l'Herbier National du Cameroun à Yaoundé où un spécimen a été déposé sous la référence 23434 YA.

II.1.2. Lignées cellulaires

Toutes les cellules ont été fournies par la banque cellulaire *Cell Bank, Type Culture Collection* de l'*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China*.

II.1.2.1. Les cellules L-02

La lignée cellulaire nommée « L-02 » dérive directement des hépatocytes d'adulte humain sain. Les cellules L-02 sont utilisées pour étudier les principaux mécanismes de toxicité de divers agents toxiques. Ces cellules sont métaboliquement compétentes et ont un niveau d'activité du cytochrome P450 comparable à celui des hépatocytes primaires humain.

II.1.2.2. Les cellules Huh7.5

C'est une lignée cellulaire d'hépatomes humains qui dérive de la ligné Huh-7 isolée pour la première fois en 1982 chez un patient japonais de 57 ans atteint d'une tumeur de foie (**Nakabayashi et al., 1982**). Les cellules Huh7.5 se multiplient en monocouche sur des plaques de culture ou sur boîtes de pétri. Elles sont hautement permissives au VHC et utilisées pour les tests antiviraux.

II.1.2.3. La bactérie *Escherichia coli* DH5 alpha

La lignée cellulaire compétente, *E. coli* DH5 α a été utilisée pour l'amplification du plasmide Jc1/Gluc2A ayant servi à la génération des particules virales infectieuses produites en culture cellulaire.

II.1.2.4. Les particules virales VHCcc ou virus infectieux produits en culture cellulaire

Le système utilisé pour la production des VHCcc est constitué d'un virus chimérique de souche J6/JFH-1 appelé Jc1/Gluc2A appartenant au génotype 2a (Phan *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015) dans lequel le gène « GLuc » de la luciférase de *Gaussia princeps* et le peptide d'auto-clivage « 2A » de 21 aminoacides du virus FMDV (*Foot-and-mouth diseases virus*) ont été insérés entre les protéines p7 et NS2 de la souche mère J6/JFH-1 (figure 19). Avec ce système, la luciférase est sécrétée dans le milieu d'incubation des cellules permettant ainsi un suivi non-invasif du taux d'infection et de réplication virale en mesurant l'activité de la luciférase sans toutefois lyser les cellules infectées.

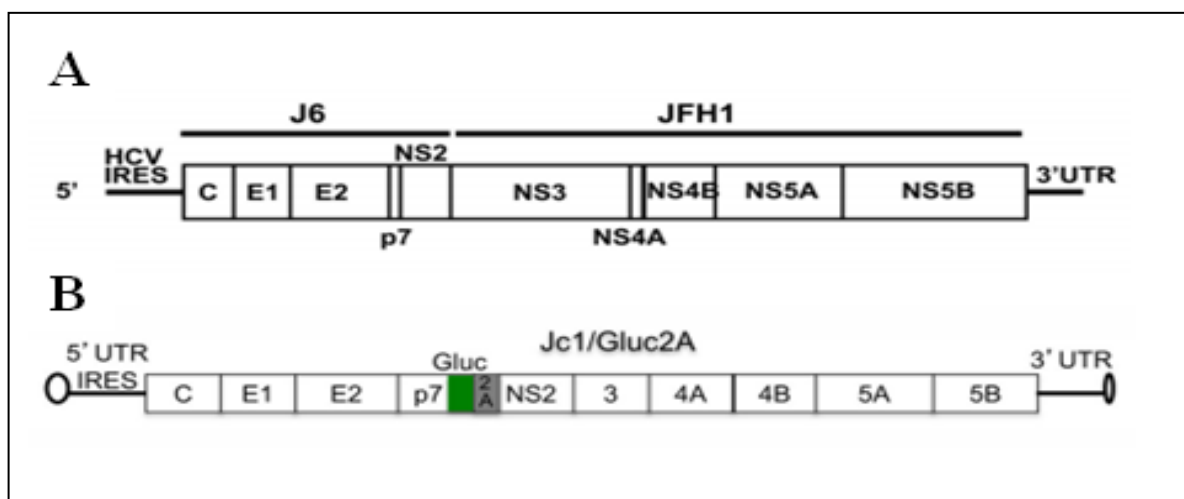


Figure 19: Carte génétique des virus chimériques J6/JFH-1 (A) et Jc1/GLuc2A (B)

IRES: internal ribosomal entry site; UTR: un-translated region

II.1.3. Réactifs et appareils

II.1.3.1. Réactifs

L'acétaminophène (APAP) et le Danoprevir (DNV) ont été achetés chez *MedChem Express (Monmouth Junction, NJ 08852, USA)*; le *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, l'acide α -Keto-glutarique, L-Alanine, l'acide thiobabaturique, l'acide trichloroacétique, le 2'-7'-*Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA)*, la silymarine, le cisplatine, le tétrachlorure de carbone (CCl₄), le *JNK inhibitor SP600125*, le *MITOISO2 - Mitochondria Isolation Kit* ont été achetés chez *Sigma-Aldrich (St Louis, USA)*; le *M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent*, le *NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Proteins Extraction Kit*, L'enzyme *XbaI* le *Halt protease inhibitor cocktail EDTA-Free 100X*, le *Pierce bicinchoninic acid (BCA) Proteins Assay Kit*, le *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* les anticorps *mouse monoclonal anti-HCV core primary antibody*, *secondary antibody Alexa fluor 488 goat anti-mouse*, *secondary antibody FITC goat anti-rabbit* ont été achetés chez *Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)*. L'anticorps *Rabbit polyclonal anti-CYP2E1* a été fourni par *Sino Biological Inc (Beijing, China)*; les anticorps *Rabbit polyclonal anti-phospho-JNK1/JNK2* et *JNK2* ont été achetés chez *Signalway Antibody (Baltimore, USA)*; les anticorps *Rabbit polyclonal anti-MKP-1*, *Nrf2*, *Keap-1*, *AIF*, *COX IV*, *LaminB*, *CD81*, *OAS-3*, *PI4KA*, *DGAT-1* et *mouse polyclonal anti-Bax* ont été achetés chez *Beijing Biosynthesis Biotechnology CO., LTD (Beijing, China)*; les anticorps *Mouse monoclonal anti- β -actin primary antibody*, *horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse IgG AP-linked secondary antibodies* ont été achetés chez *Santa Cruz Biotechnology (Ca., USA)*; le *TRIzol® Reagent*, le *mMESSAGE mMACHINE T7 in vitro transcription kit*, le *Lipofectamine 2000*, le milieu de culture *Oti-MEM* ont été achetés chez *Ambion Lifes Technologies (Carlsbad, California, USA)*; le *First-Strand cDNA Synthesis Kit* a été fourni, le *Renilla 5x*

Lysis buffer ont été fournis par *Promega (Madison, USA)*; le *iTaq Universal SYBR Green Supermix Kit* a été fourni par *Bio-Rad Laboratories (Ca., USA)*; le *BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit* a été acheté chez *NEW ENGLAND BioLabs*. Le *Radio-immuno-precipitation assay (RIPA) buffer* a été acheté chez *Beyotime Biotechnology (Nanning, China)*; L'anticorps *Rabbit polyclonal anti-HCV NS5B* a été fourni par *GeneTex (Ca, USA)*. Toutes les amorces des gènes d'intérêts ont été synthétisées par *TSINGKE Biological Technology Company (Beijing, China)*. Tous les autres réactifs utilisés dans cette étude étaient de grade analytique.

II.1.3.2. Appareils

Chromatographe liquide *Series 1200 (Agilent Technologies, Ca, USA)*; Spectromètre de masse à haute résolution *Agilent 1200 HPLC/6520*; Spectromètre *BRUKER AV 500 SPECTROMETER*; lecteur de plaque (*Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific*); spectrophotomètre (*SpectraMax M5, Molecular Devices*); Incubateur à CO₂ 5% ; Centrifugeuse réfrigérée de marque *Thermo Fisher Scientific*; Vortex ; Bloc chauffant; générateur de courant électrique (*Biorad Powerpac Universal System*); spectrophotomètre *NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific)*; thermo-cycler *Eastwin (Life Science)*; thermo-cycler *Applied Biosystems 7500 System*; luminomètre *GLOMAX™ 20/20*; Microscope à fluorescence *Advance Microscopy Groups*; Microscope optique à phase inverse de marque *OLYMPUS AXIOVERT 40C*. Trans-illuminateur UV de marque *Bio-Rad*.

II.2. Méthodes

II.2.1 Préparation de l'extrait brut, des fractions et sous-fractions de *K. grandifoliola*

➤ Préparation de l'extrait brut

Les écorces de *K. grandifoliola* ont été découpées, lavées, séchées à l'air libre à l'ombre pendant 2 semaines et broyées à l'aide d'un moulin électrique. L'extrait brut a été préparé par macération de 500g de la poudre obtenue dans 2L du système dichlorométhane (CH_2Cl_2)/méthanol (CH_3OH) (1:1, v/v) pendant 48h. L'extraction a été renouvelée plusieurs fois jusqu'à épuisement de la poudre. Le mélange était remué régulièrement à l'aide d'une baguette de verre. Le macérât collecté a été filtré sur papier whatman N°1 et le filtrat concentré sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait final obtenu a été séché à température ambiante, pour donner une croûte de couleur marron foncé de masse 73g.

➤ Préparation de la fraction KgF25

La fraction KgF25 a été préparée selon le procédé décrit par **Njayou *et al.* (2016)**. Soixante-dix grammes d'extrait précédemment préparé ont été fixés avec 70 g de silice et soumis à un dégrossissement par chromatographie flash (figure 20) sur gel de silice 60 (taille des particules: 40-63 μm) en utilisant le système $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ de gradient de polarité croissante. En effet, l'extrait a été élué successivement avec 2L du système solvant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (100:0, v/v), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5, v/v), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (90:10, v/v), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (75:25, v/v) et $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (0:100, v/v). A l'issue de ce dégrossissement, 5 fractions ont été obtenues et nommées KgFc (fraction au CH_2Cl_2), KgF5 (fraction méthanol 5%), KgF10 (fraction méthanol 10%), KgF25 (fraction méthanol 25%) et KgFm (fraction méthanol 100%). De récentes études effectuées dans notre laboratoire (**Njayou *et al.*, 2015; Njayou *et al.*, 2016; Galani *et al.*, 2016**) ont démontré que la fraction KgF25 était la plus active contre l'hépatotoxicité induite par l'acétaminophène, le CCl_4 , et contre le

développement du virus de l'hépatite C *in vitro*. De ce fait, seule cette fraction active (KgF25) a été soumise au sous-fractionnement par chromatographie sur colonne silice.

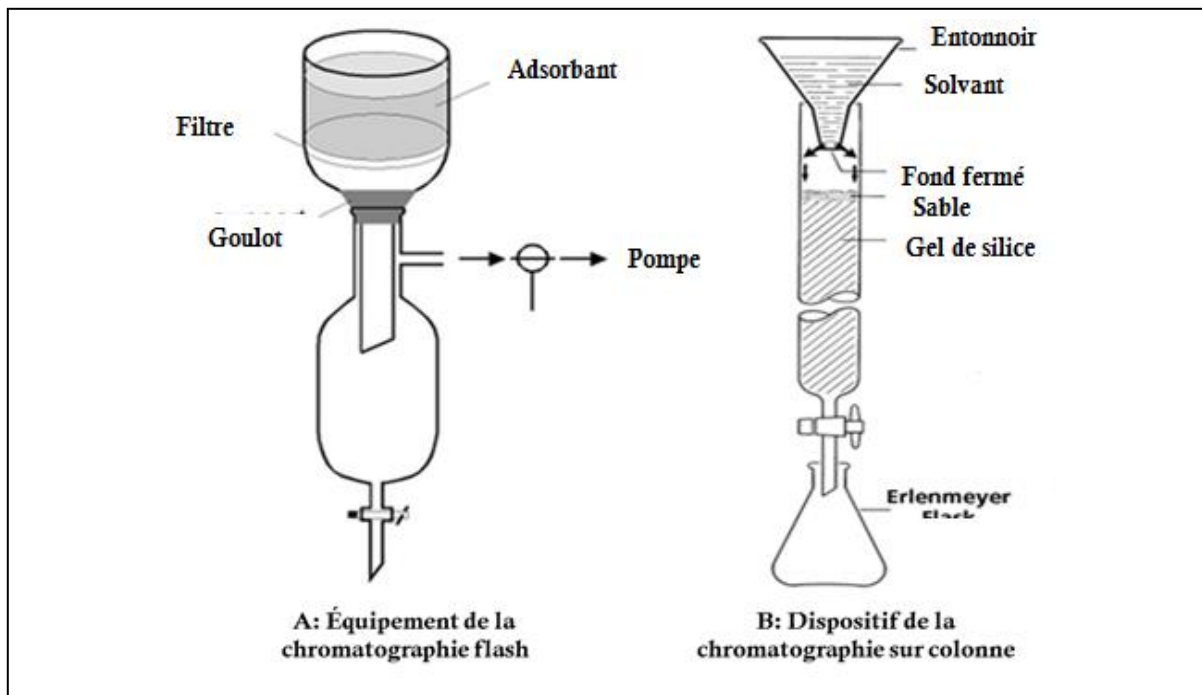


Figure 20: Systèmes chromatographiques utilisés pour les fractionnements

➤ **Fractionnement de KgF25 par chromatographie sur colonne**

Quinze grammes de la fraction KgF25 ont été fixés à 15 g de silice et soumis à la chromatographie sur colonne (colonne: d x h = 3,5 x 65 cm). Les systèmes solvants de polarité croissante hexane/acétate d'éthyle (100:0 v/v à 0:100 v/v), puis acétate d'éthyle/méthanol (10:90 v/v à 0:100 v/v) ont successivement été utilisés pour l'élué. Au total, 239 éluats de 100 mL chacun ont été recueillis de la colonne. Après évaporation, 47 fractions contenant des cristaux solides ont été analysées qualitativement par chromatographie sur couche mince (CCM) suivie d'une révélation à la lumière ultra-violette et regroupées en 5 sous-fractions nommés KgF25sf1 (41mg); KgF25sf2 (67mg); KgF25sf3 (19mg); KgF25sf4 (105mg) et KgF25sf5 (55mg) sur la base de la similarité de leur profil CCM. La figure 21 ci-après présente le diagramme schématique de ce fractionnement. Après les tests bio-guidés sur les modèles d'hépatotoxicité induite par le cisplatine et l'APAP (hépatite toxique

médicamenteuse), et le CCl_4 (hépatite toxique due au polluant), les sous-fractions actives ont fait l'objet d'une analyse par chromatographie liquide de haute pression (HPLC) préparative suivie de la purification et de la caractérisation de quelques composés présents dans chacune des sous-fractions actives.

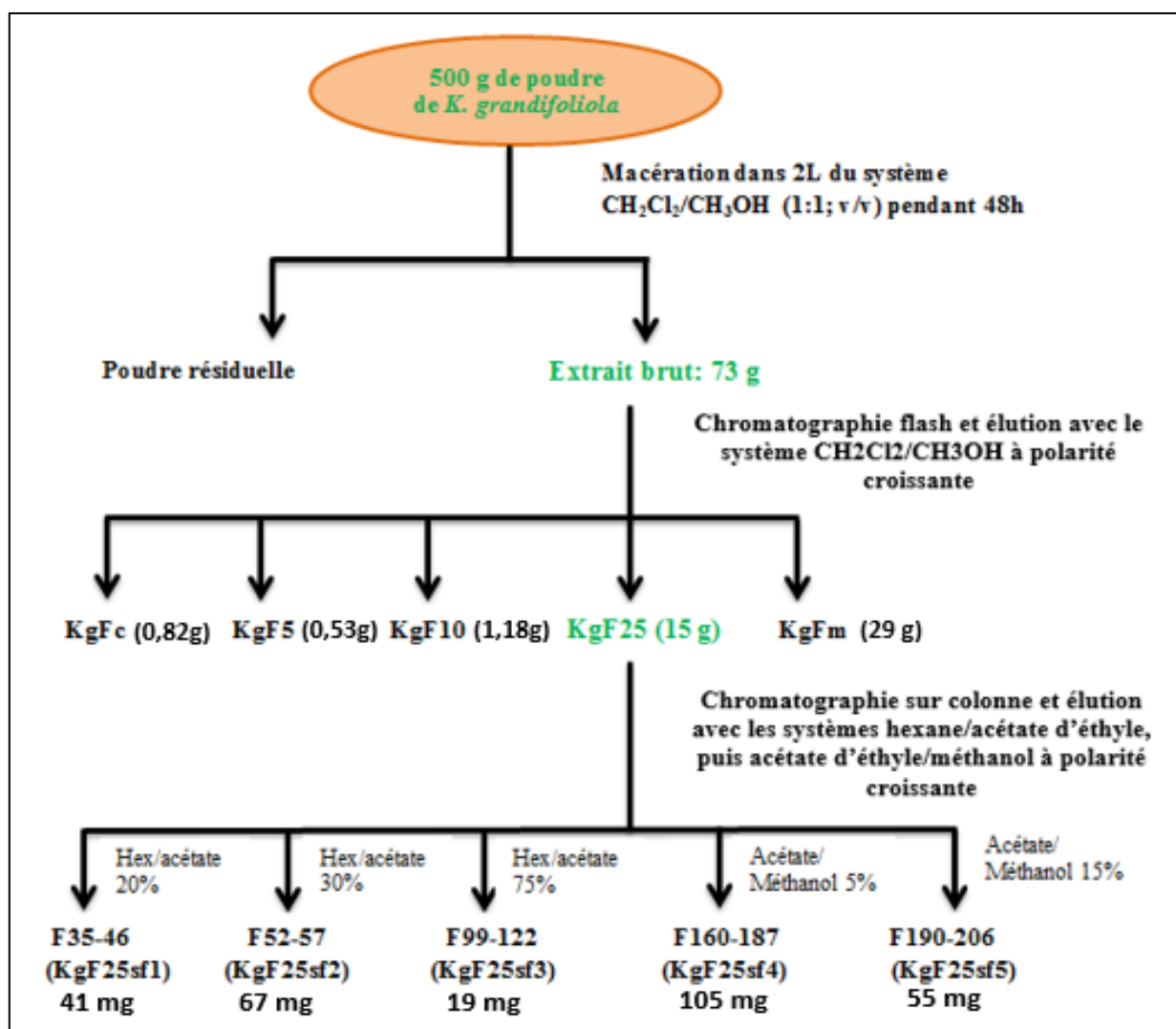


Figure 21: Diagramme du fractionnement de l'extrait brut de *K. grandifoliola*

II.2.2 Analyse des sous-fractions actives par chromatographie liquide de haute pression (HPLC) et purification des composés

Les sous-fractions actives ont été analysées par la méthode dite « *HPLC-ACN (Acetonitrile)-Standard-Method* » et les composés purifiés par la méthode « *HPLC-ACN-Standard-Purify-Method* ». Un Chromatographe Liquide Series 1200 (Agilent Technologies,

Ca, USA) équipé d'un dégazeur à vide, d'une pompe quaternaire, d'un échantillonneur automatique et d'un détecteur DAD (*Diode-Array-Detector*) connecté au logiciel « Agilent ChemStation » a été utilisé avec une colonne de type Eclipse XDB-C8 (d x h = 9,4 x 250 mm; taille des particules 5 μm). La phase mobile était constituée de l'eau distillée (A) et de l'acétonitrile (B). Le débit était 1 mL/min. Les conditions d'élution étaient les suivantes: 0-15 min, gradient progressif de 0 à 30 % B; 15-20 min, gradient linéaire 100 % B; 20-25 min, gradient linéaire 30 % B. Le système a été opéré à 28°C et le volume d'injection de chaque échantillon dilué dans le méthanol (1 mg/mL) était de 5 μL . Le profil d'absorption des composés a été suivi à 254 nm et les chromatogrammes ont été enregistrés.

II.2.3 Caractérisation des composés purifiés par spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) et par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La masse molaire de chaque composé pur dissous dans le méthanol (1 mg/mL) a été déterminée en mesurant leur spectre de masse haute-résolution au spectromètre *Agilent 1200 HPLC/6520 High-resolution mass spectrometer*. De même, la structure chimique des composés purs a été déterminée par RMN ^1H et ^{13}C . Les spectres RMN ^1H et ^{13}C de chaque échantillon dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) (5 mg/mL) ont été enregistrés aux fréquences 600 MHz et 150 MHz respectivement en utilisant un spectromètre de marque *BRUKER AV 500 SPECTROMETER*. L'exploitation des spectres obtenus en vue de la détermination de la structure chimique des différents composés s'est faite avec le logiciel MestReNova version 6.1.1 pour windows.

II.2.3 Culture cellulaire et test de viabilité

Les cellules L-02 et Huh7.5 ont étéensemencées dans des boîtes de pétri (10 cm de diamètre) à raison de 1×10^7 cellules pour 10 mL de milieu DMEM (Dulbecco's Modified

Eagle's Medium) supplémenté avec 10 % sérum de veau, L-glutamine (2 mM), pénicilline (100 IU/mL), streptomycine (100 µg/mL) et amphotéricine B (0,25 µg/mL), tous fournis par Lifes Technologies, Darmstadt, Allemagne (Carlsbad, CA, USA). Les cellules L-02 ont été cultivées en atmosphère 5 % CO₂ à 37°C. Après 2 jours d'incubation, les boîtes présentaient une confluence de 80-100% et un surnageant de couleur jaunâtre. Ce surnageant a été aspiré et les cellules lavées 2 fois avec 5 mL de tampon phosphate salin (PBS 0,1M; pH 7,4) stérile. Après lavage, les cellules ont été détachées par incubation pendant 3 min avec 2 mL d'une solution de PBS contenant 0,1 M de trypsine et 0,25% d'EDTA. La collecte a été ensuite réalisée en ajoutant 3 mL de milieu de culture frais et l'ensemble a été mélangé plusieurs fois à l'aide d'une pipette. Une fois collectées, les cellules ont été centrifugées (800g, 5 min, 25°C). Le culot cellulaire a été décanté et les cellules ont été suspendues dans 10 mL de milieu DMEM frais. Cent microlitres de cette suspension ont été prélevés pour le test de viabilité au Bleu Trypan dans une cellule de *Neubauer*. Une partie des cellules a été réensemencée dans de nouvelles boîtes de culture, et le reste a été utilisé directement pour les expériences.

➤ **Test de viabilité au Bleu Trypan (Strober, 2001)**

- **Principe**

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

- **Procédure**

Pour réaliser ce test, une solution de Bleu Trypan à 0,4% diluée dans le PBS a été utilisée. Dans un tube eppendorf de 1,5 mL, 100 µl de la suspension cellulaire fraîchement préparée ont été introduits, puis 400 µl de la solution de Bleu Trypan 0,4%. L'ensemble a été mélangé 3 à 4 fois à l'aide d'une micropipette, puis 10 µl de la suspension obtenue ont été prélevés et déposés dans la chambre de *Neubauer* (figure 22). La préparation a été ensuite observée sous microscope optique et les cellules vivantes et mortes ont été comptées à l'aide d'un hémocytomètre.

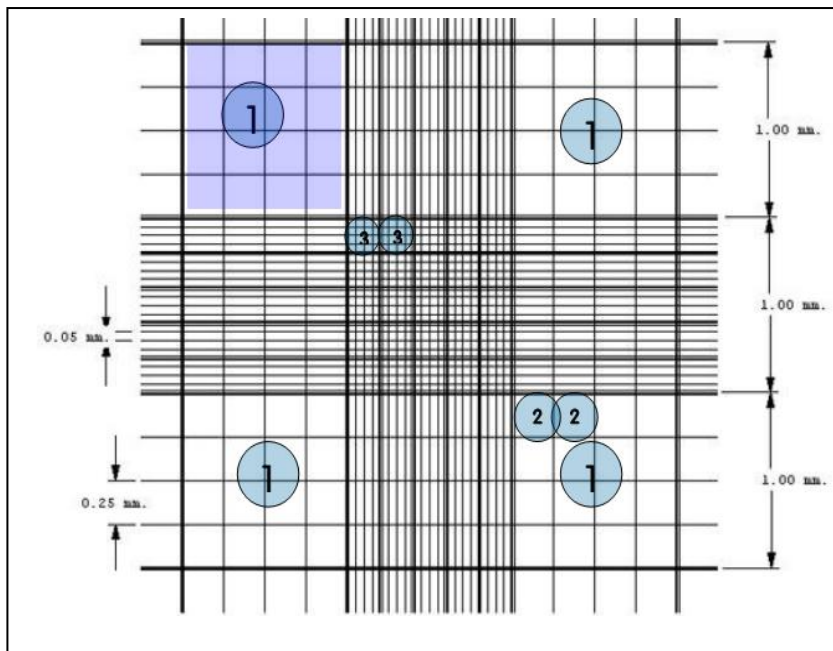


Figure 22: Chambre de Neubauer

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

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

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

Avec: $fd = \text{facteur de dilution} = 500/100 = 5$

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

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

II.2.4. Evaluation de l'effet des sous-fractions et composés de KgF25 contre l'hépatotoxicité induite par le cisplatine, l'acétaminophène ou le tétrachlorure de carbone

II.2.4.1. Préparation des différentes substances toxiques, des sous-fractions et composés de KgF25 et des composés hépto-protecteurs de référence

L'APAP, le CCl₄ ou le cisplatine (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) ont été dilués dans le DMSO 20% (DMSO dilué à 20% dans le PBS) et préparés aux concentrations stocks de 3000 mM pour l'APAP et le CCl₄ et, 3000 µM pour le cisplatine. Ces derniers ont été utilisés pour l'induction de l'hépatotoxicité. Les composés de référence que sont la silymarine et le *JNK inhibitor SP600125* (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) ont été dilués respectivement dans le DMSO 20% et DMSO 100% et préparés aux concentrations initiales respectives de 100 000 µg/mL et 10 000 µM. Les sous-fractions et composés isolés de KgF25 dilués dans le DMSO 20% ont été préparés aux concentrations initiales de 100 00 µg/mL et 10 000 µM respectivement. Toutes ces solutions stocks ont ensuite été filtrées en utilisant des filtres à seringue (0,22 µm) dans les conditions stériles. Les filtrats obtenus ont été répartis en aliquotes et conservés à -20°C jusqu'au moment de l'utilisation.

II.2.4.2. Traitement des cellules: procédure générale

La procédure générale d'évaluation des propriétés anti-hépatotoxiques des sous-fractions et composés isolés de KgF25 consistait à ensemercer les cellules L-02 à raison de 2×10^5 cellules/mL/puits dans les plaques de 12 puits et incubées à 37°C, pendant 24h en atmosphère humide, 5% CO₂. Ensuite, le milieu de culture était remplacé avec du milieu frais et les cellules incubées en absence (groupe témoin) ou en présence de la substance toxique (groupe toxique); ou en présence du toxique et des composés de références, des sous-fractions ou des composés isolés de KgF25 (groupe test) pendant différent temps (6; 12; 24 et 36h) en fonction des analyses biochimiques à effectuer après traitement des cellules. Les toxiques ont été utilisés aux concentrations létales 50 (CL₅₀) préalablement déterminées. Avant l'évaluation des propriétés anti-hépatotoxiques, l'effet des sous-fractions et des composés isolés sur la viabilité des hépatocytes L-02 a été examiné.

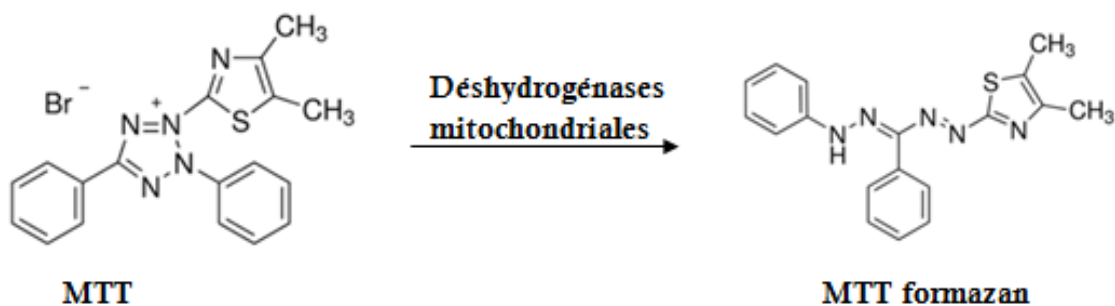
II.2.4.3. Détermination de l'effet des sous-fractions et composés isolés de KgF25 sur la viabilité des hépatocytes L-02

Pour étudier l'effet des sous-fractions et composés isolés de KgF25 sur la viabilité des cellules, les cellules L-02 en culture ont été traitées avec le DMSO, les sous-fractions ou les composés purs aux concentrations finales respectives 0,2%; 500 µg/mL et 1000 µM. Après 36h d'incubation, la viabilité des cellules a été mesurée par le test de viabilité cellulaire au bromure de 3-(4.5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) tandis que l'intégrité de la membrane des cellules a été évaluée en mesurant l'activité de l'enzyme alanine aminotransférase (ALAT) libérée dans le milieu d'incubation.

➤ **Test de viabilité cellulaire au MTT (Kasugai *et al.*, 1991)**

• **Principe**

Le MTT est un sel de tétrazolium de couleur jaune qui est utilisé pour mesurer la viabilité cellulaire, la prolifération cellulaire et les effets cytotoxiques des substances chimiques ou phytochimiques. Les cellules viables métabolisent ce substrat par leurs déshydrogénases mitochondriales en formazan, produit insoluble en milieu aqueux et coloré (bleu-violet). L'intensité de la couleur produite est lue à 540-570 nm et est directement proportionnelle à la concentration de cellules viables dans le milieu.



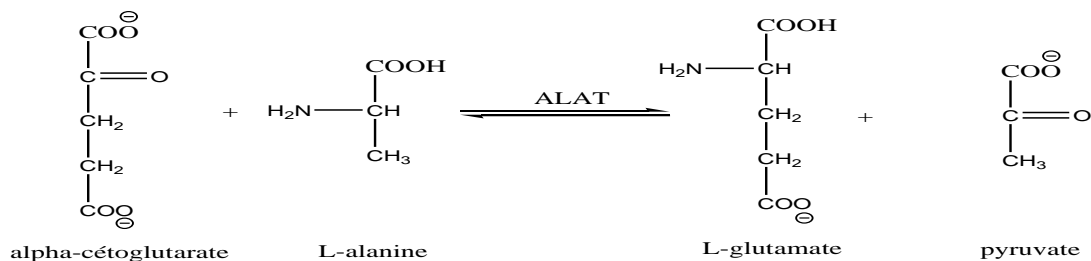
A la fin du traitement comme indiqué ci-dessus, le milieu de culture a été collecté (pour le dosage de l'activité de l'ALAT) et les cellules ont été lavées avec 500 μ L de PBS et incubées avec 200 μ L de la solution de MTT dissous dans le PBS à la concentration de 0,5 mg/mL. Après 3h d'incubation à 37°C, la solution de MTT a été aspirée et les cristaux de formazan dans les cellules ont été dissous avec 500 μ L de la solution d'isopropanol acidifiée. L'absorbance de la solution de couleur bleu-violette obtenue a été lue à 560 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (*Multiskan FC, Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA*). Les cellules du groupe témoin ont été considérées comme 100% viable. La viabilité cellulaire dans chaque groupe test a été exprimée en pourcentage du témoin et calculée comme suit:

$$\text{Viabilité (\%)} = (\text{Absorbance du groupe test} / \text{Absorbance du groupe témoin}) \times 100$$

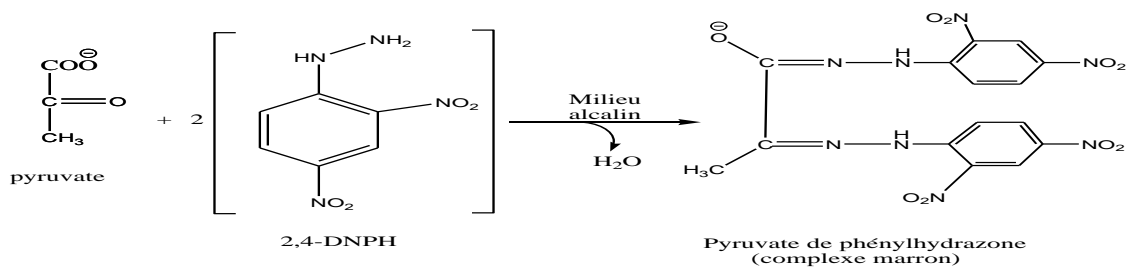
➤ **Dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (Reitman et Frankel, 1957)**

• **Principe**

L'alanine aminotransférase (ALAT) est une enzyme localisée dans le cytosol et dont une libération massive dans le milieu extracellulaire est signe d'une altération ou de la perte de l'intégrité de la membrane plasmique. Elle catalyse le transfert du groupement amine de l'alanine sur l' α -cétoglutarate pour former le pyruvate et le glutamate.



Le pyruvate ainsi formé réagit avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) pour former un dérivé hydrazone de couleur marron qui absorbe à 505 nm. L'intensité de la coloration formée est directement proportionnelle à l'activité de l'enzyme.



• **Procédure**

Dans deux tubes à essai marqués blanc et test, ont été introduit 360 μ L de substrat ALAT (Alanine 0,2M, α -cétoglutarate 2mM dans le tampon phosphate 0,1M, pH 7,4) qui ont

été pré-incubés pendant 5 min à 37°C au bain marie. Ensuite, 40 µL de surnageant et 40 µL de milieu de culture ont été ajoutés respectivement dans les tubes test et blanc. L'ensemble a été homogénéisé par agitation au vortex, puis incubé pendant 30 min à 37°C au bain marie. Deux cents microlitre de 2,4-DNPH ont été ajoutés dans tous les tubes, qui ont été homogénéisés et incubés à température ambiante pendant 20 min, puis 2 mL de NaOH 0,4 M y ont été ajoutés. Les tubes ont une fois de plus été homogénéisés et incubés à température ambiante pendant 30 min. Enfin, l'absorbance de la solution marronne formée a été lue contre le blanc à 505 nm au spectrophotomètre (*SpectraMax M5, Molecular Devices*). Les activités de l'ALAT dans le milieu ont été calculées à partir de la droite d'étalonnage (figure 23) obtenue selon le protocole du tableau 5 ci-après.

Tableau 5: Protocole d'étalonnage du pyruvate de sodium

Tubes	1	2	3	4	5
Pyruvate de Sodium (0,022mg/ml); (µl)	0	40	80	120	160
Substrat ALAT (µl)	400	360	320	280	240
2,4-DNPH (µl)	200	200	200	200	200
Homogénéisation et incubation pendant 20 min à température ambiante					
NaOH 0,4 M (ml)	2	2	2	2	2
Homogénéisation et incubation pendant 30 min à température ambiante. Puis lecture de l'absorbance à 505 nm contre le tube1.					
Activité (IU/L)	0	23	50	83	125

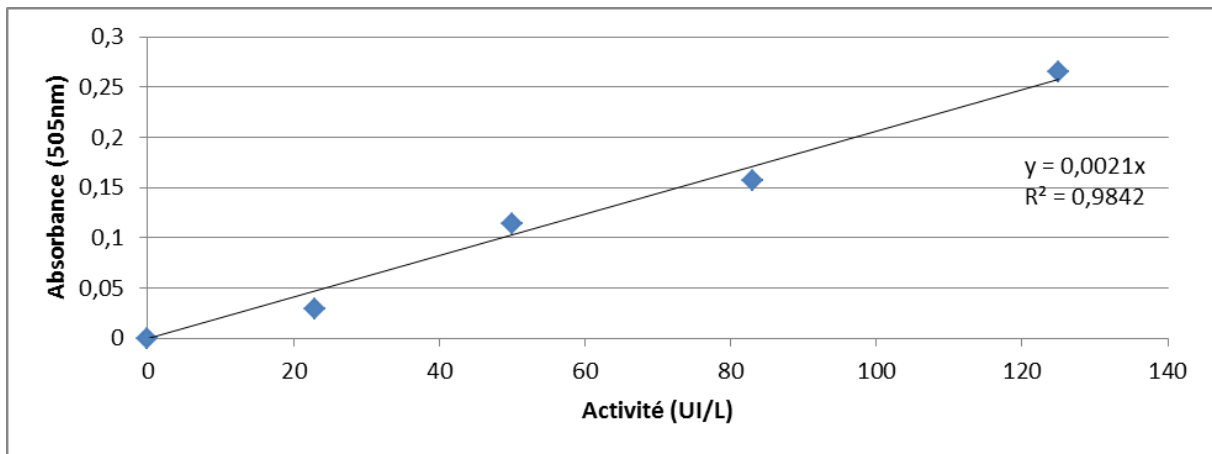


Figure 23: Droite d'étalonnage du pyruvate de sodium

II.2.4.4. Recherche de la concentration létale 50 (CL₅₀) des toxiques à utiliser

Le tétrachlorure de carbone (CCl₄), l'acétaminophène (APAP) ou le cisplatine ont été dilués dans le DMSO. Les cellules en cultures ont été intoxiquées en remplaçant le milieu de culture par 1 mL de milieu frais contenant du CCl₄ ou de l'APAP aux concentrations finales de 0; 5; 10; 15; 20 et 30 mM ou du cisplatine aux concentrations de 0; 5; 10; 15; 20 et 30 μM. Après 36h d'incubation, la viabilité et l'intégrité membranaire des cellules ont été évaluées comme décrit au paragraphe **II.2.4.3** et la CL₅₀ de chaque toxique a été déterminée en utilisant la courbe concentration-réponse respective.

II.2.4.5. Criblage de l'activité anti-hépatotoxique des sous-fractions de KgF25 et étude concentration-réponse des sous-fractions actives et des composés isolés

Les cellules en culture ont été traitées séparément avec les différents toxiques à leur CL₅₀ respective et les sous-fractions ou la silymarine à la concentration finale de 100 μg/mL pour le criblage de l'activité anti-hépatotoxique. Après 36h d'incubation, la viabilité et l'intégrité membranaire des cellules ont été évaluées comme décrit au paragraphe **II.2.4.3**. Les sous-fractions actives sélectionnées et la silymarine ont été testées aux concentrations finales de 25; 50 et 100 μg/mL pour l'étude concentration-réponse. Les composés isolés ont

été testés aux concentrations finales de 10; 20; 30 et 40 μM . Dans le cas de l'APAP et du cisplatine, le *JNK inhibitor SP600125* a été utilisé comme composé hépatoprotecteur de référence et testé aux concentrations finales respectives de 5; 10; 15 et 20 μM . Concernant le CCl_4 , la silymarine a été utilisée comme composé de référence. Après 36h d'incubation, la viabilité cellulaire et l'intégrité membranaire des cellules ont été évaluées et les concentrations efficaces 50 (CE_{50}) déterminées en utilisant la courbe concentration-réponse respective.

II.2.4.6. Etude des propriétés anti-hépatotoxiques des composés isolés

Les propriétés hépatoprotectrices des composés isolés ont été étudiées en évaluant leurs effets sur la toxicité induite par le cisplatine, le CCl_4 ou l'APAP par mesure de la viabilité cellulaire, la production des espèces oxygénées réactives (EOR), la peroxydation lipidique membranaire et le taux de glutathion (GSH) cellulaire.

II.2.4.6.1. Test de viabilité cellulaire à l'iodure de propidium/4',6'-diamino-2-phénylindole

➤ Principe

L'iodure de propidium (PI) et le 4',6'-diamino-2-phénylindole (DAPI) sont des molécules fluorescentes ayant la capacité de s'intercaler entre les bases des acides nucléiques. Le PI de nature hydrophobe pénètre uniquement dans les cellules mortes et émet une fluorescence rouge à 617 nm tandis que le DAPI est un marqueur d'ADN qui peut traverser aussi bien la membrane des cellules vivantes que mortes et émet une fluorescence bleue à 461 nm. Ainsi, toutes les cellules (mortes ou vivantes) apparaîtront en bleue au microscope à fluorescence à 461 nm contrairement aux cellules mortes, qui seront colorées en rouges à 617 nm.

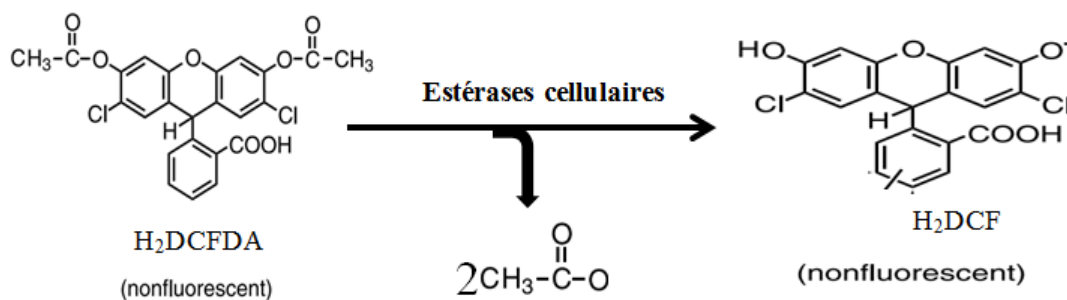
➤ Procédure

Les cellules ont étéensemencées à raison de 2×10^5 cellules/mL/puits dans les plaques de 12 puits et incubées pendant 24h. Ensuite, le milieu de culture a été aspiré et remplacé avec 1 mL de milieu frais contenant les différents toxiques à leur CL_{50} respective et les composés isolés ou de références à une concentration prédéterminée. Après 36h d'incubation, le milieu a été aspiré et les cellules lavées avec 500 μ L de PBS. Ensuite, 200 μ L de la solution de PI (10 μ g/mL) ont été ajoutés et les cellules incubées pendant 5 min à 37°C. Puis, les cellules ont été lavées 2 fois avec 1 mL de PBS et incubées avec 200 μ L de la solution de DAPI (1 μ g/mL) pendant 25 min à température ambiante. Après 2 lavages avec 1 mL de PBS, les cellules ont été visualisées au microscope à fluorescence (*Advanced Microscopy Group*) aux longueurs d'onde de 617 et 461 nm et les images enregistrées.

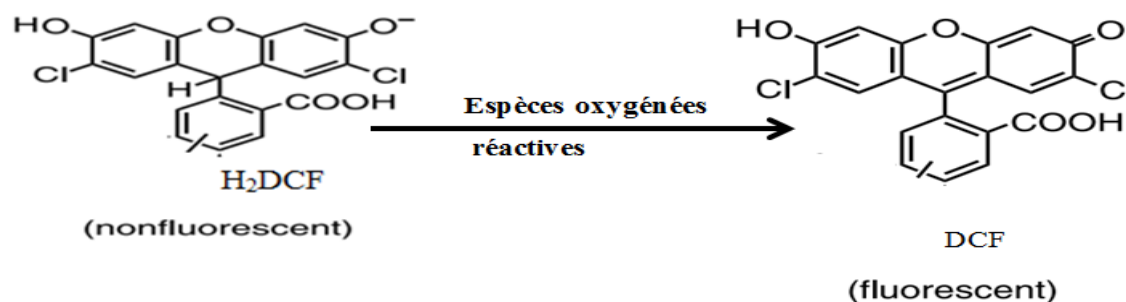
II.2.4.6.2. Evaluation de la production intracellulaire des espèces oxygénées réactives

➤ Principe

Le 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (H₂DCFDA) est une molécule capable de pénétrer dans les cellules où il est deacétylé par les estérases cellulaires pour former un produit non fluorescent, le 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine (H₂DCF).



Le H₂DCF formé est ensuite oxydé par les espèces oxygénées réactives (EOR) pour former le 2'7'-dichlorofluoresceine (DCF) qui, excité à 485 ± 20 nm, émet une fluorescence à 525 ± 20 nm dont l'intensité est directement proportionnelle au taux d'EOR dans la cellule (Mathew *et al.*, 2008).



➤ Procédure

Les cellules en culture ensemencées 24 h plus tôt à raison de 2 x 10⁵ cellules/mL/puits dans les plaques de 12 puits ont été traitées en remplaçant le milieu de culture avec 1 mL de milieu frais contenant 20 µM de H₂DCFDA, les différents toxiques à leur CL₅₀ respective et les composés isolés ou de référence à une concentration prédéterminée. Après 36h d'incubation, le milieu a été aspiré et les cellules lavées avec 500 µL de PBS et immédiatement lysées avec 500 µL de tampon de lyse (tampon Tris 50 mM, pH 7,5 contenant 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM NaF, 0,5% NP-40, 10% glycérol). Les lysats cellulaires ont été collectés, centrifugés (10 000g, 5 min, 4°C) et 100 µL du surnageant ont été transférés dans les plaques de 96 puits et la fluorescence a été mesurée par excitation à 485 ± 20 nm et émission à 525 ± 20 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (SpectraMax M5, Molecular Devices). Les taux d'EOR ont été exprimés en pourcentage du témoin et calculés comme suit:

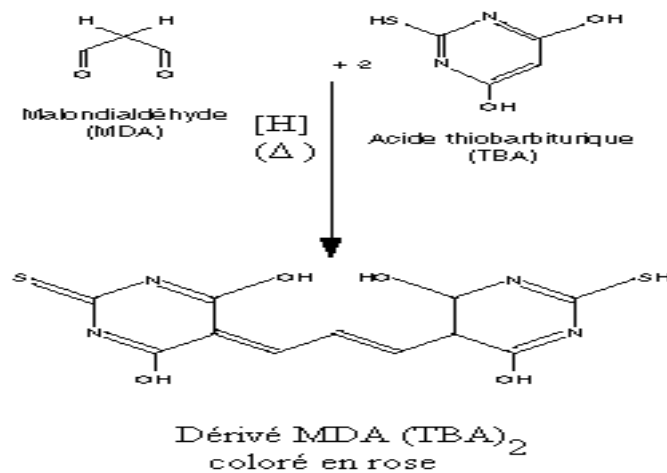
$$\% \text{ EOR} = (\text{Fluorescence du groupe test} / \text{Fluorescence du groupe témoin}) \times 100$$

II.2.4.6.3. Evaluation de la peroxydation lipidique membranaire

Elle a été faite par le dosage du malondialdéhyde (MDA) (Buege et Aust, 1978).

➤ Principe

Le MDA est un produit terminal de la peroxydation des lipides. En milieu acide et à chaud (pH 2-3, 100°C), une molécule de MDA se condense avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré rose qui absorbe à 532 nm.



➤ Procédure

Les cellules en culture ensemencées 24 h plus tôt à raison de 2×10^5 cellules/mL/puits dans les plaques de 12 puits ont été traitées en remplaçant le milieu de culture par 1 mL de milieu frais contenant les différents toxiques à leur CL_{50} respective et les composés isolés ou de références à une concentration prédéterminée. Après 36h d'incubation, 500 μ L du surnageant cellulaire ont été transférés dans un tube à essai. Puis 500 μ L d'acide trichloroacétique (TCA 20% P/v) et 500 μ L d'acide thiobarbiturique (TBA 0,67% P/v) ont été ajoutés dans le tube. Le mélange obtenu a été homogénéisé et chauffé dans l'eau bouillante pendant 20 min. Après refroidissement dans un bain de glace pendant 5 min, le mélange a été centrifugé (4000g, 10 min, 4°C), puis le surnageant a été collecté et l'absorbance lue à 532

nm contre le blanc où le surnageant cellulaire a été remplacé par le milieu DMEM frais. Les concentrations en MDA ont été calculées selon la formule suivante.

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

Avec:

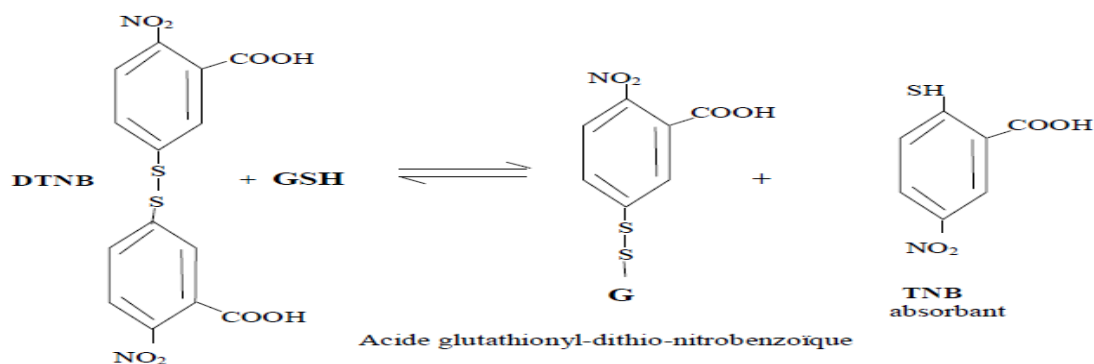
- DO = densité optique
- V_{ts} = volume total du surnageant cellulaire (μL)
- ϵ_{MDA} = coefficient d'extinction molaire du MDA = $1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- V_{sp} = volume du surnageant cellulaire prélevé pour le dosage (μL)
- l = trajet optique (1 cm)

II.2.4.6.4. Dosage du glutathion cellulaire

Elle a été faite selon la méthode décrite par **Ellman (1959)**.

➤ Principe

Elle est basée sur la réaction d'oxydation du glutathion par l'acide 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) de couleur jaune absorbant à 412nm. L'intensité de la coloration obtenue étant proportionnelle à la quantité de glutathion dans le milieu.



➤ Procédure

Les cellules en culture ensemencées 24 h plus tôt à raison de 2×10^5 cellules/mL/puits dans les plaques de 12 puits ont été traitées en remplaçant le milieu de culture par 1 mL de milieu frais contenant les différents toxiques à leur CL_{50} respective et les composés isolés ou de références à une concentration prédéterminée. Après 6, 12, 24 ou 36h d'incubation, le milieu a été aspiré et les cellules lavées avec 500 μ L de PBS et immédiatement lysées avec 500 μ L de tampon de lyse (tampon Tris 50 mM, pH 7,5 contenant 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM NaF, 0,5% NP-40, 10% glycérol). Les lysats cellulaires ont été collectés et centrifugés (10 000g, 5 min, 4°C). Ensuite, 20 μ L du surnageant et 20 μ L de tampon de lyse ont été introduits respectivement dans les tubes à essai marqué blanc et tests. Puis 3 mL du réactif d'Ellman (tampon phosphate pH 7,5; 0,1 M contenant du DTNB 0,05 mM) ont été ajoutés dans chaque tube. Après homogénéisation, les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 1 heure, puis l'absorbance des tubes tests a été lue à 412 nm contre le blanc et les teneurs en glutathion en ont été calculés selon la formule suivante:

$$[GSH](\mu\text{M}/\text{mg protéines}) = \frac{DO \times V_{ts} \times 10^6}{\epsilon_{\text{glutathion}} \times V_{sp} \times l \times Q_{\text{protéine}}}$$

Avec:

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

II.2.4.7. Analyse des mécanismes moléculaires anti-hépatotoxiques des composés actifs isolés de KgF25

Les mécanismes moléculaires anti-hépatotoxiques des composés actifs isolés de la fraction KgF25 ont été étudiés en utilisant les techniques de *western blot* et *quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)*. L'expression de quelques protéines [cytochrome

P450 2E1 (CYP2E1), *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), *Apoptosis-inducing factor* (AIF), *Bcl2-associated X protein* (Bax), *Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1* (Mkp-1), *Nuclear factor-erythroid 2(NF-E2) related factor-2* (Nrf2), *Kelch-like ECH-associated protein-1* (Keap-1)] impliquées dans le mécanisme de mort cellulaire induite par l'APAP, le CCl₄ et le cisplatine a été évaluée par *western blot*. De même, leurs effets sur l'expression des gènes de quelques enzymes du système de défense antioxydant [catalase (CAT), *glutathione-s-transferase* (GST), superoxyde dismutase (SOD) et *methionine adenosyl-transferase-1A* (MAT1A) ont été étudiés par (qRT-PCR)].

II.2.4.7.1. Analyse de l'expression des protéines par *Western Blot*

II.2.4.7.1.1. Définition

Le *Western Blot* également appelé transfert de protéines, est une technique de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification des protéines dans un échantillon biologique (sérum, homogénat tissulaire, lysat cellulaire) à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines que l'on souhaite détecter. Il permet ainsi de visualiser des protéines particulières dans un mélange complexe (**Renart *et al.*, 1979**).

Le *Western blot* utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer les protéines, préalablement dénaturées selon leur taille. Ces protéines sont ensuite transférées sur une membrane où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Il est possible grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine dans un tissu, d'évaluer sa taille, sa concentration, les variations de cette concentration, d'effectuer des comparaisons de concentrations entre différents groupes... (**Towbin *et al.*, 1979**).

II.2.4.7.1.2. Traitement des cellules, extraction des protéines et fractionnement subcellulaire

➤ Traitement des cellules

Les cellules en culture ensemencées 24 h plus tôt à raison de 2×10^5 cellules/mL/puits dans les plaques de 12 puits ont été traitées en remplaçant le milieu de culture par 1 mL de milieu frais contenant les différents toxiques à leur CL_{50} respective et les composés isolés ou de référence à une concentration prédéterminée. Après 6, 12, ou 24h d'incubation, le milieu a été aspiré et les cellules lavées avec 500 μ L de PBS.

➤ Extraction des protéines totales

Après traitement des cellules, les protéines totales ont été extraites à l'aide du kit d'extraction *M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA)* contenant 0,2% du cocktail d'inhibiteur de protéases *Halt protease inhibitor cocktail EDTA-free 100X (Thermo Fischer Scientific, USA)* en suivant les instructions du fabricant. Une fois les cellules lavées avec du PBS, 400 μ L de la solution d'extraction ont été ajoutés dans chaque puits et les plaques de cultures mises sous faible agitation à température ambiante pendant 5 min. Les lysats ont ensuite été transférés dans les tubes Eppendorf et centrifugés (15 000 g, 15 min, 4°C). Les surnageants obtenus constituant ainsi les protéines totales ont été transférés dans de nouveaux tubes, congelés par immersion dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à analyse par *western blot*.

➤ Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires

Les protéines des fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été extraites à l'aide du kit d'extraction *NE-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA)* contenant 0,2% du cocktail d'inhibiteur de protéases *Halt protease inhibitor cocktail*

EDTA-free 100X (Thermo Fischer Scientific, USA) en suivant les instructions du fabricant. Le Kit d'extraction contient 3 réactifs nommés CER I, CER II et NER. A la fin du traitement, les cellules ont été lavées avec 500 μ L de PBS, détachées des plaques de culture avec la trypsine-EDTA, transférées dans les tubes Eppendorff de 1,5 mL et centrifugées (500g, 5 min, 4°C). Le culot cellulaire obtenu a été de nouveau suspendu dans le PBS et centrifugé (500g, 5 min, 4°C). Le surnageant a été éliminé à l'aide d'une micropipette, laissant le culot cellulaire aussi sec que possible. Ensuite 500 μ L du réactif CER I ont été ajoutés et les tubes ont été agités vigoureusement pendant 15 secondes au vortex. Après incubation dans la glace pendant 10 min, 27,5 μ L du réactif CER II ont été ajoutés, les tubes agités au vortex pendant 5 secondes, incubés dans la glace pendant 1 min et centrifugés (16 000g, 5 min, 4°C). Le surnageant obtenu constituant ainsi la fraction cytoplasmique a été transféré dans un nouveau tube et conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Le culot de débris cellulaires contenant le noyau a été suspendu dans 250 μ L du réactif NER. Les tubes ont été agités vigoureusement pendant 15 secondes au vortex et incubés dans la glace pendant 10 min. L'agitation au vortex a été répétée toutes les 10 min pour un temps total de 40 min. Enfin, les tubes ont été centrifugés (16 000g, 10 min, 4°C) et les surnageants obtenus constituant la fraction nucléaire ont été transférés dans de nouveaux tubes et conservés à -80°C jusqu'au moment de l'utilisation.

➤ **Extraction des protéines mitochondriales**

Les protéines mitochondriales ont été extraites à l'aide du kit d'extraction *MITOISO2-Mitochondria Isolation Kit* (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Mo, USA) en suivant les instructions du fabricant. Le Kit d'extraction contient 3 réactifs nommés *Extraction Buffer A 5x*, *Cellytic M Cell Lysis Reagent* et *Protease Inhibitor Cocktail*. A la fin du traitement, les cellules ont été lavées avec 500 μ L de PBS, détachées des plaques de culture avec la trypsine-EDTA, transférées dans les tubes Eppendorff de 1,5 mL et centrifugées (500g, 5 min, 4°C).

Le culot cellulaire obtenu a été de nouveau suspendu dans le PBS et centrifugé (500g, 5 min, 4°C). Le surnageant a été éliminé à l'aide d'une micropipette, laissant le culot cellulaire aussi sec que possible. Un millilitre du réactif d'extraction *Extraction Buffer A 5x*, dilué 5 fois avec de l'eau ultra-pure a été ajouté dans chaque tube et les cellules ont été homogénéisées à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce appliquant environ 30 à 40 coups. Cette opération a permis de rompre la membrane plasmique des cellules. L'homogénat obtenu a été centrifugé (600g, 10 min, 4°C) afin de précipiter le noyau et d'autres débris cellulaires. Le surnageant obtenu contenant les mitochondries a été transféré dans un nouveau tube, centrifugé (11 000g, 10 min, 4°C) et le surnageant éliminé. Le culot obtenu constituant les mitochondries a été suspendu dans 200 µL du réactif *Cellytic M Cell Lysis Reagent* contenant le *Protease Inhibitor Cocktail* dans les proportions 1:100 v/v afin d'obtenir les protéines mitochondriales qui ont été conservées à -80°C jusqu'au moment de l'utilisation.

La concentration en protéines dans les différentes fractions (Lysat cellulaire total, fractions cytoplasmique, nucléaire et mitochondriale) a été déterminée par la méthode à l'acide bicinchoninique dans le but de normaliser les concentrations en protéines de tous les échantillons à une seule concentration avant l'analyse par *Western Blot*.

II.2.4.7.1.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué par la méthode utilisant l'acide bicinchoninique (Simith *et al.*, 1985).

➤ Principe

Les protéines réduisent les ions cuivriques (Cu^{2+}) en ions cuivreux (Cu^+) en milieu alcalin. Suite à cela, le sel de l'acide bicinchoninique réagit avec les ions Cu^+ pour former un

complexe coloré pourpre ayant une absorption optique maximale à 562 nm, l'absorbance étant directement proportionnelle à la concentration en protéines.

➤ Procédure

Le kit de dosage *Pierce BCA Proteins Assay* (Thermo Fisher Scientific, USA) a été utilisé en respectant les instructions du fabricant. Le kit contient 3 réactifs nommés: *BCA Reagent A* contenant du carbonate de sodium, du bicarbonate de sodium, l'acide bicinchoninique et le tartrate de sodium dans 0,1 M d'hydroxyde de sodium; *BCA Reagent B* contenant 4% de sulfate de cuivre; *Albumin Standard Ampules* contenant la BSA (*bovine serum albumin*) à 2 mg/mL. La solution de travail a été préparée en mélangeant les réactifs *BCA Reagent A* et *BCA Reagent B* dans les proportions 50:1 v/v respectivement. Le standard BSA a été dilué avec l'eau ultra-pure aux concentrations finales respectives de 0 ; 25 ; 125 ; 250 ; 500 ; 1000 ; 1500 et 2000 µg/mL et tous les échantillons à doser ont été dilués 15 fois dans l'eau ultra-pure. L'étalonnage et l'essai ont par la suite été réalisés comme indiqué dans le tableau 6 ci-après. La concentration en protéines de chaque échantillon a été déterminée à l'aide de la droite d'étalonnage (figure 24) et en tenant compte du facteur de dilution

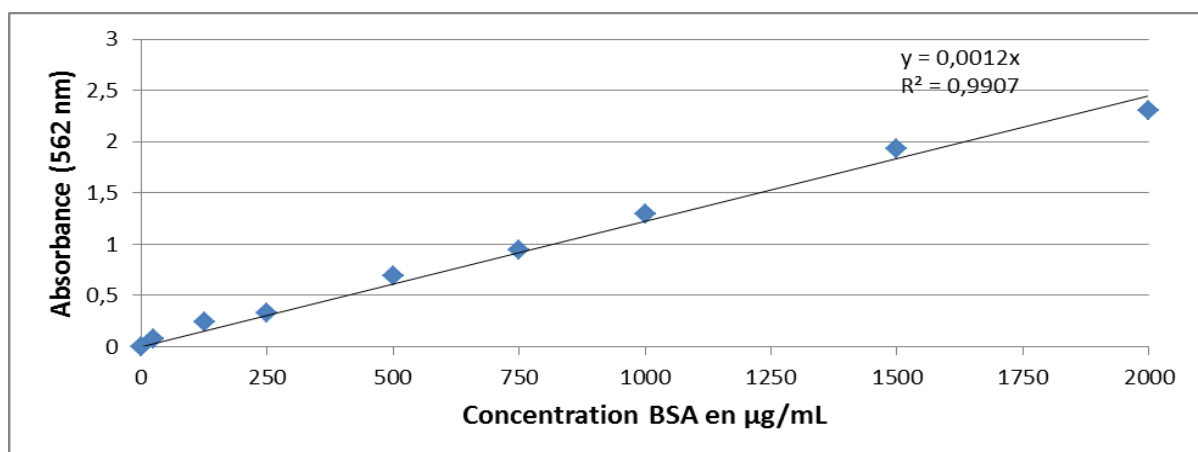


Figure 24: Droite d'étalonnage de la BSA

Tableau 6: protocole du dosage des protéines

	Etalonnage									Essai	
Puits	A	B	C	D	E	F	G	H	I	blanc	test
Eau pure (µL)	25	/	/	/	/	/	/	/	/	25	0
BSA (µL)	0	25	25	25	25	25	25	25	25	/	/
Echantillon à tester (µL)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	25
Solution de travail (µL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
[BSA] (µg/mL)	0	25	125	250	500	750	1000	1500	2000	/	/
Homogénéiser vigoureusement pendant 30s, remettre le couvercle de la plaque et incuber 30 min à 37°C, puis lire l'absorbance à 562 nm											

II.2.4.7.1.4. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE)

➤ Principe et description de la technique (Laemmli, 1970)

L'électrophorèse est une technique de séparation fondée sur la migration à travers un support (matrice de polymère ou gel de polyacrylamide ou d'agarose) des molécules chargées positivement ou négativement sous l'effet d'un champ électrique.

En biochimie ou en biologie moléculaire, l'électrophorèse sur gel est utilisée pour la séparation des protéines ou des acides nucléiques en fonction de leur taille et de leur charge électrique. Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur. Deux principaux polymères sont utilisés: l'agarose et le polyacrylamide dont on peut faire varier la concentration. Ainsi, pour l'électrophorèse sur gel d'agarose, l'agarose est utilisé à des concentrations de 0,5 à 2% (masse/volume) et permet de séparer des molécules de grande taille, principalement l'ADN ou l'ARN. Quant à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, sa concentration peut varier de 4 à 20% (masse/volume) et permet de séparer les molécules de petite taille: protéines, peptides et fragments d'acide nucléiques. Pour ce dernier cas, le gel peut se faire en conditions natives ou en conditions dénaturantes en présence du dodécyl sulfate de sodium. On parle alors de SDS-PAGE ou *Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*.

❖ SDS-PAGE

La technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (*Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis* ou SDS-PAGE) consiste à dénaturer à chaud un mélange de protéines en présence d'un agent réducteur: le β -mercapto-éthanol ou le dithiothréitol (DTT) qui réduit les ponts disulfures; et d'un détergent anionique fort: le SDS qui confère à toutes les protéines du mélange une charge négative. Les protéines de l'échantillon sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS.

➤ Procédure

La première étape consiste à couler le gel de séparation et le gel de concentration entre deux plaques de verre. Le dispositif nécessaire pour la préparation du gel est présenté sur la

figure 25 ci-après tandis que la composition des différents gels est présentée dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7: Composition des gels pour SDS-PAGE

Réactifs (en mL)	Gel de séparation (12% Acrylamide) Vf = 50 mL	Gel de concentration (5% Acrylamide) Vf = 10 mL
Eau distillée	16,5	6,8
Acrylamide 30%	20	1,7
Tampon Tris-HCl 1,5M pH 8,8	12,5	/
Tampon Tris-HCl 1M pH 8,8	/	1,25
SDS 10%	0,5	0,1
Persulfate d'ammonium 10%	0,5	0,1
TEMED	0,02	0,01

TEMED: N, N, N', N'-tétraméthyl-1,2-diamino-méthane; Vf: volume final.

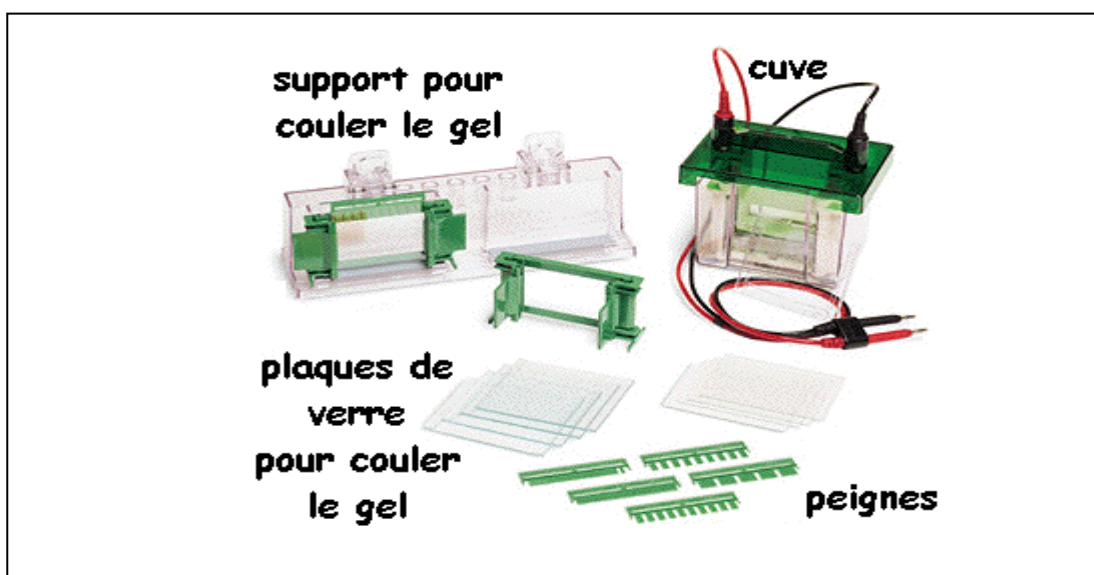


Figure 25: Dispositif utilisé pour la préparation et la migration du gel

Le gel de séparation (12% acrylamide) a été coulé en premier en introduisant environ 6 mL de cette solution entre les plaques de verre. Le gel a été ensuite recouvert avec de l'isopropanol pour permettre une solidification homogène à température ambiante pendant 20 min. Après solidification du gel de séparation, l'isopropanol a été éliminé et remplacé avec environ 2 mL de la solution du gel de concentration et les peignes de 1 mm d'épaisseur ont été introduits afin de former les puits servant pour le dépôt des échantillons.

Après la préparation du gel, les protéines ont été diluées dans le tampon de *Laemmli* 5 fois concentré (tampon Tris-HCl 1 M, pH 6,8 contenant 100 mM DTT, 12% SDS, 4% bleu de bromophénol) et chauffées à 100°C pendant 10 min dans un block chauffant. Dix microlitres du mélange obtenu contenant 50 µg de protéines (pour tous les échantillons à analyser) ont été introduits dans les puits. L'électrophorèse s'est ensuite déroulée en présence du marqueur de poids moléculaire *pre-stained marker* (Thermo Fisher Scientific, USA) en utilisant le générateur *Biorad Powerpac Universal System* pour générer le courant électrique. Dans le gel de concentration, la migration s'est effectuée sous un courant de tension 80 V pendant 30 min suivi d'un courant de tension 120 V pendant 60 min pour la migration dans le gel de séparation à l'aide du tampon d'électrophorèse conducteur: Tris 50 mM – Glycine 0,2 M – SDS 0,1% - pH 8,5.

II.2.4.7.1.5. Transfert et détection des protéines sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'anticorps

Après migration, le gel est démoulé et les protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose (Nitrocellulose Blotting Membrane, GE Healthcare, Life Science, Germany) afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps. Le montage du transfert est présenté à la figure 26 ci-dessous.

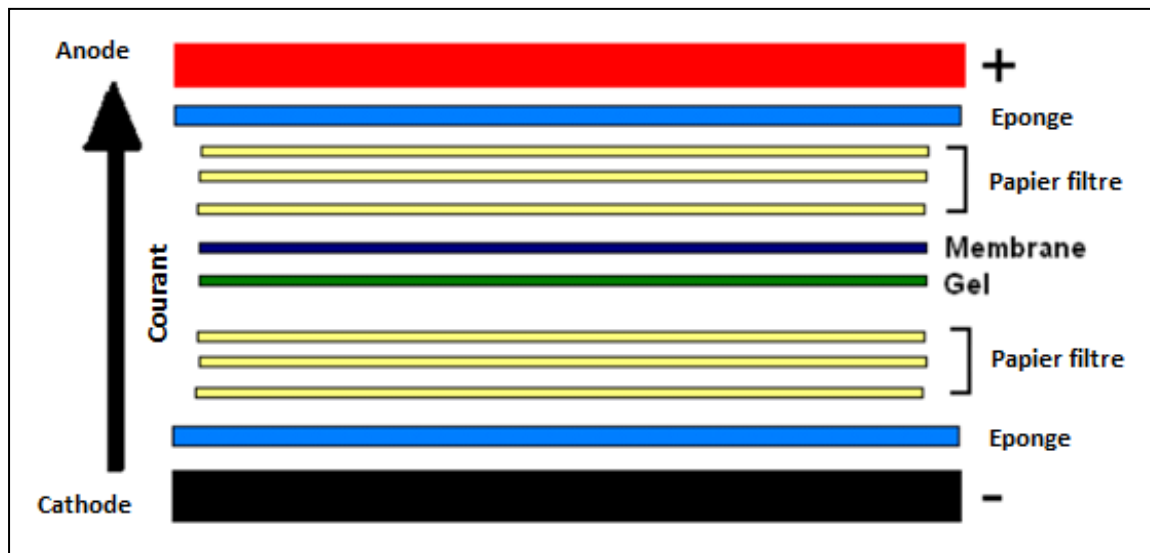


Figure 26: Montage du transfert des protéines du gel sur la membrane

Le principe du transfert est similaire à celui de la migration dans le SDS-PAGE, à savoir que les protéines chargées négativement migrent vers l'anode sous l'effet du champ électrique. La membrane étant incorporée entre le gel et l'anode, les protéines adhèrent à la membrane selon leur même disposition sur le gel. Le transfert s'est effectué sous un courant d'intensité 200 mA généré par le générateur *Biorad Powerpac Universal System* pendant 90 min en présence de la glace. Le tampon de transfert est constitué de 25 mM Tris, 190 mM Glycine et 20% Méthanol.

Une fois les protéines transférées, la membrane a été bloquée avec 5% (p/v) de lait sans matières grasses dilué dans le tampon Tris-Salin-Tween20 (TBST: Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween20 0,05% ; pH 7,6) pendant 1h à température ambiante afin de limiter les interactions non-spécifiques entre la membrane et les anticorps. Après le blocage, la membrane a été incubée toute une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire dilué dans le tampon TBST contenant 1,5% de lait sans matières grasses. Les anticorps primaires pour les protéines d'intérêts étaient: [*Rabbit polyclonal anti-CYP2E1 antibody (dilution 1:1500, Sino Sino Biological Inc, Beijing, China)*]; [*Rabbit polyclonal anti-phospho-JNK1/JNK2 et JNK2 antibodies (dilution 1:1000, Signalway Antibody, Baltimore, USA)*]; [*Rabbit polyclonal anti-*

*MKP-1, Nrf2, Keap-1, AIF, COX IV, LaminB et mouse polyclonal anti-Bax antibodies (dilution 1:1000, Beijing Biosynthesis Biotechnology CO., LTD, Beijing, China); Mouse monoclonal anti- β -actin antibody (dilution 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA)]. La membrane a été lavée 3 fois avec le tampon TBST et incubée pendant 2h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire dilué dans le tampon TBST contenant 1,5% de lait sans matières grasses. Les anticorps secondaires utilisés étaient: *Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit et anti-mouse IgG AP-linked secondary antibodies (dilution 1:2000, Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA)*. Après 3 lavages avec le tampon TBST, la membrane a été imbibée avec le réactif SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (*Thermo Fisher Scientific, USA*) et la détection des bandes de protéines a été réalisée par la méthode dite *Enhanced Chemiluminescent Method* qui combine les logiciels *MicroChem Unit* et *GelCapture*. L'analyse densitométrique des bandes de protéines obtenues a été faite à l'aide du logiciel ImageJ Software.*

II.2.4.7.2. Analyse quantitative de l'expression des gènes des enzymes antioxydants par quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

➤ Définition

La qRT-PCR est une technique d'analyse d'expression des gènes basée sur une PCR classique qui permet l'amplification d'un ADNc à l'aide d'amorces spécifiques. Les fragments d'ADNc néoformés ou amplicons sont ensuite détectés et quantifiés à mesure qu'ils se forment dans le milieu grâce à un émetteur fluorescent issu de la technologie *SYBR green*. Dans cette technique, les ADNc sont amplifiés dans le milieu en présence d'un fluorochrome à base de cyanine (le vert de SYBR) qui a la capacité de se lier à une molécule d'ADN double brin. Lorsque ce colorant se fixe à la double hélice d'ADN, il forme un complexe qui absorbe la lumière bleue ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$) et émet une fluorescence verte ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$). Plus la

quantité de produits de PCR augmente dans le milieu, plus ce fluorochrome va se fixer et plus l'intensité de la fluorescence va augmenter à 520 nm.

La qRT-PCR a été utilisée pour évaluer l'effet des composés isolés de la fraction KgF25 sur l'expression des gènes de quelques enzymes antioxydants du système de protection des hépatocytes. Il s'agit de la Catalase (CAT), du Superoxyde dismutase (SOD1), du Glutathion-S-transférase (GST) et de la Méthionine adenosyltransférase-1A. Le Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase a été utilisé comme témoin interne.

➤ **Traitement des cellules**

Les cellules en culture ensemencées 24 h plus tôt à raison de 2×10^5 cellules/mL/puits dans les plaques de 12 puits ont été traitées en remplaçant le milieu de culture par 1 mL de milieu frais contenant les différents toxiques à leur CL_{50} respective et les composés isolés ou de référence à une concentration prédéterminée. Après 36h d'incubation, le milieu a été éliminé par aspiration et les cellules lavées avec 500 μ L de PBS. Les ARN totaux ont ensuite été isolés ainsi qu'il suit.

➤ **Isolement et purification des ARN totaux**

Les ARN totaux ont été isolés des cellules à l'aide du réactif de TRIzol (Ambion, Life Technologies, Darmstadt, Germany) en suivant les instructions du fabricant. Après traitement, les cellules ont été lavées une fois avec 500 μ L de PBS. Ensuite, 500 μ L du réactif de TRIzol ont été ajoutés et les cellules homogénéisées en pipettant 10 à 15 fois. Les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant 5 min, puis les suspensions transférées dans des tubes Eppendorf RNase-free de 1,5 mL. Cent microlitres de chloroforme ont été ajoutés dans les tubes et ceux-ci ont été agités vigoureusement à la main pendant environ 15 secondes et les tubes ont été centrifugés (12 000g, 15 min, 4°C). Trois phases ont été observées: une

phase aqueuse claire supérieure qui contient les ARN; une interphase qui contient l'ADN, et une phase organique inférieure qui contient les protéines. La phase aqueuse contenant les ARN a été prélevée (environ 300 μL) et transférée dans de nouveaux tubes Eppendorf RNase-free. Les ARN ont été précipités par ajout de 250 μL d'isopropanol à la phase aqueuse supérieure. Après 20 min d'incubation à température ambiante, le culot d'ARN a été obtenu par centrifugation (12 000g, 10 min, 4°C). Ensuite, les ARN ont été lavés par suspension dans 500 μL d'éthanol 75% suivi d'une centrifugation (7 500g, 5 min, 4°C). Le surnageant a été éliminé et le culot d'ARN a été séché à l'air pendant 5 min. Finalement, le culot d'ARN a été suspendu dans 25 μL d'eau RNase-free (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Mo, USA) et incubé à 55°C dans un block chauffant pendant 5 min. Après toutes ces opérations, les ARN totaux obtenus étaient prêts pour les analyses ultérieures.

La concentration et la pureté des ARN obtenus ont été déterminées en mesurant l'absorbance à 230, 260 et 280 nm à l'aide du spectrophotomètre ND-2000 NanoDrop (*Thermo Fisher Scientific*). Comme présenté à la figure 27, le rapport des absorbances à 260/230 de tous nos échantillons d'ARN variait entre 1,9-2,12 tandis que le rapport des absorbances à 260/280 était supérieur à 2,2. Ces valeurs indiquent que les ARN étaient purs. De même, l'intégrité des ARN a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour cela, 2,5 μL d'échantillon d'ARN ont été mélangés à 0,5 μL de tampon de charge *5X loading buffer* (Takara, Japon) et déposé dans les puits du gel d'agarose à 1% préparé avec le tampon de migration TAE (tampon Tris/Acétate 40 mM, EDTA 1mM, pH 8) contenant du bromure d'éthidium (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nécessaire pour la révélation des bandes d'ARN. La migration a été effectuée sous un courant de tension 100 V pendant 20 min. Le gel a été visualisé sous un trans-illuminateur UV en utilisant l'appareil *Bio-Rad Trans-illuminator* combiné au logiciel *Quantity One Gel Documentation System*. Comme présenté à la figure 27, de distinctes bandes d'ARN ribosomal de 28S et 18S ont été obtenues pour chaque échantillon. Les bandes

d'ARNr 28S étaient approximativement deux fois plus large que les bandes d'ARNr 18S, indiquant que les ARN totaux extraits étaient intacts et pouvaient être utilisés pour la qRT-PCR. Mais avant, ils ont été convertis en ADNc.

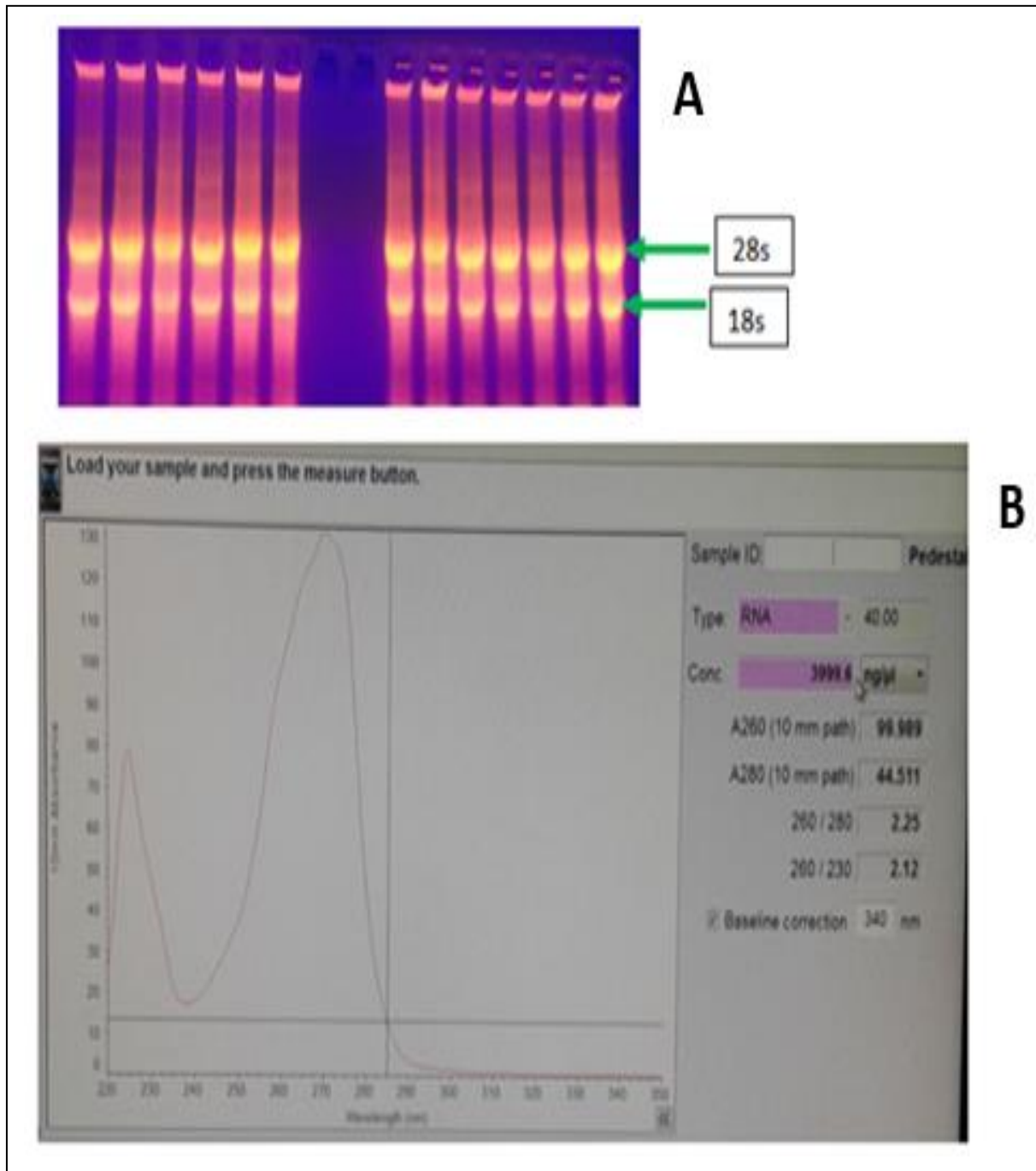


Figure 27: Intégrité et qualité des ARN vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose et par spectrophotométrie

(A) image du logiciel *Quantity One Gel Documentation System*; (B) photographie direct sous lumière UV. (C) concentration de l'ARN donnée par le spectrophotomètre ND-2000 NanoDrop.

➤ Synthèse des ADNc par reverse transcription

Les ADNc ont été synthétisés dans un thermo-cycler (*Eastwin, Life Science*) en utilisant la transcriptase reverse *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV-RT, Promega) en respectant les instructions du fabricant. Dans un tube de micro-centrifugation RNase-free, 2 µg d'ARN ont été mélangé avec 0,5 µg d'amorces d'oligoDT (oligoDT, Promega). Le mélange a été chauffé (5 min; 70°C) pour linéariser l'ARN et éliminer toute structure tridimensionnelle, puis refroidi immédiatement dans un bain de glace. Ensuite, les composants ci-après ont été ajoutés: 3 µL du tampon de réaction M-MLV 5X; 0,75 µL de transcriptase reverse M-MLV-RT; 0,75 µL de dNTP; 0,5 µL de Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor et l'eau RNase-free pour compléter le volume final réactionnel à 15 µL. L'élongation s'est déroulée à 42°C pendant 60 min suivi de la dénaturation de la transcriptase reverse M-MLV-RT à 90°C pendant 5 min. Les ADNc obtenus ont été conservés à 4°C et soumis à la quantification par qRT-PCR pour la mesure de l'expression des gènes cibles.

➤ Amplification des ADNc par PCR quantitative en temps réel ou qRT-PCR

La qRT-PCR a été réalisée dans un thermo-cycler Applied Biosystems 7500 System en utilisant le kit *iTaqTM Universal SYBR[®] Green Supermix* (Bio-RAD Laboratories, Ca, USA) en suivant les instructions du fabricant. Le volume réactionnel était constitué ainsi qu'il suit: 1 µL d'ADNc, 10 µL de *iTaqTM Universal SYBR[®] Green Supermix*, 0,4 µL (25 µM) de chaque amorce (sens 5'-3' et anti-sens 3'-5') et 8,2 µL d'eau RNase-free. La qRT-PCR a débuté par une dénaturation initiale de l'ADNc et l'activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 5 min, suivi de 40 cycles. Les paramètres du cycle étaient les suivantes: dénaturation de l'ADN à 95°C (30 secondes), hybridation avec les oligonucléotides (amorces) à 58°C pendant (45 secondes) et l'élongation du fragment d'ADN à amplifier à 72°C pendant

60 secondes. Les 40 cycles ont été suivis d'une élongation finale à 72°C pendant 15 min. Les amorces de tous les gènes d'intérêts ont été synthétisées par la compagnie TSINGKE Biological Technology Company (Beijing, China). Leurs séquences sont présentées dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8: Séquences des amorces utilisées pour la qRT-PCR

Gènes	Séquence d'oligonucléotides ou amorces (5' ____ 3')	
	Sens	Anti-sens
CAT	AGGCCAGTCCTGACAAAATG	GAATCTCCGCACTTCTCCAG
SOD1	GAAGGTGTGGGGAAGCATTA	ACATTGCCCAAGTCTCCAAC
GST	TTGGCCTCCTGTATTCCTTG	AGCCAACCTGGATGCTGAGTT
MAT1A	TAGGGACTGACCAGCAGCTT	AGGGACCAGGGAAAGAGAAA
GAPDH	CGACCACTTTGTCAAGCTCA	AGGGGTCTACATGGCAACTG

CAT: Catalase; SOD1: Superoxyde dismutase1; GST: Glutathion-S-Transférase; MAT1A: Méthionine adenosyltransferase-1A; GAPDH: Glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase.

L'expression relative des gènes d'intérêts a été calculée selon la formule $2^{-\Delta\Delta CT}$ à l'aide du logiciel *GenEX Software* en mesurant la valeur CT (*Cycle threshold*) pendant la phase d'augmentation exponentielle de la fluorescence. En effet, le CT correspond au nombre de cycles de PCR qu'il faut à un échantillon d'ADNc (X) amplifié pour que la fluorescence soit détectée pendant la phase exponentielle d'amplification. Cette valeur a été normalisée à celle du gène standard GAPDH utilisé comme témoin interne et à celle du groupe témoin (cellules non traitée).

Ainsi, $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (groupe traité) - ΔCT (groupe témoin) où $\Delta CT = Ct$ (Gène d'intérêt) - Ct (Gène standard).

II.2.5. Evaluation *in vitro* de l'effet des composés isolés de KgF25 sur les étapes clés du cycle infectieux du VHC

L'effet des composés isolés de la fraction active KgF25 de *K. grandifoliola* sur les étapes clés du cycle viral infectieux du VHC a été évalué. Dans cette partie de notre étude, les cellules Huh7.5 hautement permissives au VHCcc ont été utilisées. Elles ont été cultivées dans le milieu DMEM supplémenté de 10% de FBS. Cependant, avant tout essai antiviral, il était nécessaire de produire *in vitro* les particules VHCcc devant être utilisées pour infecter les cellules Huh7.5. Cette production s'est faite en plusieurs étapes comme présenté ci-dessous.

II.2.5.1. Production des particules VHCcc

II.2.5.1.1. Production des cellules compétentes

Les cellules compétentes ayant servi à l'amplification du plasmide Jc1/Gluc2A ont été générées par la méthode au chlorure de calcium. Brièvement, une colonie isolée bactérienne de la souche *Escherichia coli* a été sélectionnée sur une plaque d'agar et amplifiée dans 50 mL de milieu de culture stérile Luria-Bertani (LB: 10 g NaCl, 10 g tryptone, 5 g d'extrait de levure dans 1 L d'eau distillée et stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 min) à 37°C sous agitation pendant 45 min. Puis, la suspension bactérienne a été transférée dans 2 L du milieu LB et amplifiée à 37°C pendant 5h. Les cellules ont ensuite été centrifugées (5 000g, 5 min, 4°C) et le culot a été suspendu dans 300 mL d'une solution glacée de MgCl₂ 100 mM et incubé dans la glace pendant 10 min. Le mélange a été centrifugé (5 000g, 5 min, 4°C), et le culot a été suspendu dans 300 mL d'une solution glacée de CaCl₂ 100 mM et incubé dans la glace pendant 30 min. Le mélange a été centrifugé à nouveau (5 000g, 5 min, 4°C) et le culot cellulaire suspendu dans 100 ml d'une solution glacée de CaCl₂ 100 mM contenant 20 % de glycérol. Les aliquotes de 100 µL de la suspension bactérienne ont été préparés et conservés à

-80°C. Après ce traitement, les bactéries sont désignées sous le nom de « cellule compétente DH5α *E.coli* ». Elles peuvent désormais être utilisées pour l'amplification du plasmide.

II.2.5.1.2. Insertion du plasmide dans les cellules compétentes

Le plasmide Jc1/Gluc2A (gracieusement offert par Dr. Yi Shi, *Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China*) contenant le gène de résistance à l'ampicilline a été inséré dans les cellules compétentes par un processus appelé transformation cellulaire. Les cellules compétentes DH5α *E.coli* prises à -80°C ont été décongelées dans la glace. Sous une hôte à flux laminaire, 5 µg de plasmide circulaire Jc1/Gluc2A ont été ajoutés à 50 µL de cellules compétentes. Le mélange a été homogénéisé et incubé dans la glace pendant 30 min. Puis le tube contenant le mélange a subi un choc thermique par incubation successive à 42°C dans un bain marie pendant 1 min et dans la glace pendant 2 min. Ensuite, 500 µL de milieu LB sans antibiotique ont été ajoutés dans le tube et les cellules ont été incubées à 37°C sous agitation pendant 45 min pour permettre la propagation des cellules. Les cellules ont été ensuite centrifugées (5 000g, 5 min, 4°C) et le surnageant éliminé. Le culot a été suspendu dans 70 µL de milieu LB et étalé sur les boîtes de Pétri agar-LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline. Les boîtes de Pétri ont été incubées en position inverse pendant 24 h à 37°C pour sélectionner les cellules transformées ampicilline-résistante et multiplier le plasmide.

Les boîtes de Pétri agar-LB-ampicilline ont été préparées en ajoutant 7,5 g (1,5%) d'agar à 500 mL de milieu LB. Le mélange a été stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 min, puis refroidi autour de 40°C. Ensuite, l'ampicilline a été ajoutée à la concentration finale de 100 µg/mL. Le mélange agar-LB-ampicilline a été réparti dans les boîtes de pétris dans un environnement stérile. Après refroidissement complet, les boîtes ont été conservées à 4°C jusqu'au moment de l'utilisation.

II.2.5.1.3. Multiplication et extraction du plasmide dans les cellules transformées ampicilline-résistante

Après 24 h de culture à 37°C, seules les bactéries ayant incorporées le plasmide pouvait croître sur le milieu agar-LB-ampicilline formant des colonies isolées. Une colonie a été prélevée et introduite dans 10 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/mL), puis incubée à 37°C sous agitation pendant 24 h pour permettre la multiplication des bactéries et par conséquent la multiplication du plasmide. A la fin de la période d'incubation, les bactéries ont été centrifugées (10 000g, 2 min, 25°C), le surnageant éliminé et le culot utilisé pour l'extraction des plasmides.

L'extraction des plasmides de la bactérie s'est faite à l'aide du kit *TIANprep Universal Plasmid Extraction Kit (TianGen, Beijing, China)* en suivant les instructions du fabricant. Ce kit contient 6 tampons nommés P1, P2, P3, BL, PD et PW. L'extraction a commencé par suspension du culot bactérien dans 250 µL du tampon P1. La suspension a été homogénéisée à l'aide d'un vortex pendant 15 secondes. Puis 250 µL du tampon P2 ont été ajoutés et le contenu du tube mélangé par inversion. Ensuite 350 µL du tampon P3 ont été ajoutés et après homogénéisation par inversion, le tube a été centrifugé (13 400g, 10 min, 25°C). En parallèle, une mini-colonne (permettant une séparation par centrifugation) muni d'un tube collecteur a été équilibrée par ajout de 500 µL de tampon BL suivi d'une centrifugation (13 400g, 1 min, 25°C). Le surnageant collecté après centrifugation (13 400g, 10 min, 25°C) a été introduit dans la mini-colonne. Après centrifugation, (13 400g, 1 min, 25°C), le liquide collecté a été éliminé. Puis, 500 µL du tampon PD ont été introduits dans la mini-colonne et après centrifugation (13 400g, 1 min, 25°C), le liquide collecté a été éliminé. Ensuite, 700 µL du tampon PW ont été introduits dans la mini-colonne et après centrifugation (13 400g, 1 min, 25°C), le liquide collecté a été éliminé. L'opération s'est déroulée 2 fois avec le tampon PW.

La mini-colonne uniquement a ensuite été centrifugé (13 400g, 2 min, 25°C), insérée dans un tube Eppendorf RNase-free et séchée à 65°C dans un block chauffant pendant 2 min. Enfin, 40 µL d'eau DNase-free ont été introduits dans la mini-colonne. Après centrifugation (13 400g, 2 min, 25°C), la concentration du plasmide circulaire (DNA) contenu dans le liquide collecté a été déterminée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop ND2000. Le plasmide a été ensuite conservé à -20°C jusqu'au moment de l'utilisation.

II.2.5.1.4. Linéarisation du plasmide circulaire

Le plasmide Jc1/GLuc2A a été linéarisé avec l'enzyme *XbaI* (*Thermo Fisher Scientific, USA*) et purifié par extraction au phénol/chloroforme. Le mélange réactionnel a été constitué de 2 µL (20 µg) de plasmide, 4 µL d'enzyme *XbaI*, 10 µL de tampon réactionnel 10X *XbaI* et 84 µL d'eau *DNase-free*. Le mélange a été incubé pendant 12 h à 37°C. A la fin de l'incubation, 100 µL de phénol/chloroforme ont été ajoutés, le mélange obtenu a été homogénéisé et centrifugé (13 400g, 5 min, 4°C). Après centrifugation, deux phases ont été observées: La phase supérieure (\approx 100 µL) contenant le plasmide linéarisé a été transféré dans un nouveau tube dans lequel 100 µL de chloroforme ont été ajouté et après centrifugation (13 400g, 2 min, 4°C), le surnageant (phase supérieure) a été transféré dans un autre tube. Ensuite 10 µL d'acétate de sodium 3 M et 300 µL d'éthanol glacé (100%) y ont été ajoutés. Le mélange obtenu a été incubé (30 min, -20°C) afin de précipiter les plasmides, puis centrifugé (13 400g, 15 min, 4°C). Le surnageant a été éliminé et le culot d'ADN (plasmide) lavé avec 1 mL d'éthanol 70% par centrifugation (13 400g, 15 min, 4°C). Le surnageant a été éliminé, le culot séché à l'air pendant 5 min et dissous dans 11 µL d'eau DNase-free. Enfin, 1 µL de la solution d'ADN a été utilisé pour mesurer la concentration du plasmide linéarisé (à l'aide du NanoDrop ND2000) devant servir pour la transcription *in vitro*.

II.2.5.1.5. Transcription *in vitro* du plasmide linéaire

Le kit *mMESSAGE mMACHINE T7 RNA production system* (Ambion, Life Technologies) a été utilisé. Le mélange réactionnel était constitué de 2 μL d'enzyme Mix, 2 μL de tampon réactionnel 10X, 10 μL de 2X NTP/CAP (nucléotides), 2 μL (1 μg) de plasmide linéaire et 4 μL d'eau *Nuclease-free water*. Le mélange a été incubé pendant 2 h à 37°C pour permettre la synthèse de l'ARN. A la fin de l'incubation, le plasmide linéaire a été digéré par ajout de 1 μL de Turbo DNase (Ambion, Life Technologies) suivi d'une incubation de 15 min à 37°C. Puis 115 μL d'eau *Nuclease-free* et 15 μL d'acétate d'ammonium ont été ajoutés pour stopper la réaction et les transcrits d'ARN obtenus ont été purifiés par extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'isopropanol. Ainsi, l'ARN a été successivement extrait par centrifugation (17 000g, 10 min, 4°C) avec 150 μL de phénol/chloroforme saturé et 150 μL de chloroforme. Les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes et l'ARN a été précipité par ajout de 300 μL d'isopropanol avec incubation à -20°C pendant 20 min. Le culot d'ARN obtenu après une dernière centrifugation (17 000g, 15 min, 4°C) a été suspendu dans 12 μL d'eau *RNase-free*, puis 1 μL a été prélevé pour mesurer la concentration à l'aide du NanoDrop ND2000. Les transcrits d'ARN viral peuvent désormais être transfectés dans les cellules Huh7.5 pour la production des particules VHCcc.

II.2.5.1.6. Transfection des cellules Huh7.5 et production des particules VHCcc

Les cellules Huh7.5 ont étéensemencées dans les plaques de 6-puits à raison de 5×10^5 cellules/puits et incubées pendant 24 h. Le milieu a été éliminé par aspiration et la transfection s'est effectuée en incubant les cellules avec le complexe de lipo-transfection contenant 5 μg de transcrits ARN et 10 μL de lipofectamine 2000 (Invitrogen) dilués dans 2 mL de milieu Opti-MEM (Invitrogen) pendant 12 h. L'excédent du complexe de lipo-transfection a été éliminé par aspiration et les cellules transfectées ont été incubées avec du

milieu DMEM frais. Le milieu a été remplacé tous les trois jours et les surnageants collectés ont été clarifiés par centrifugation (16 000g, 5 min, 25°C), repartis en aliquotes et utilisés soit pour mesurer l'activité relative de la luciférase sécrétée dans le milieu, soit conservé à -80°C comme source des particules VHCcc pour les études d'infection.

II.2.5.2. Détermination de la dose infectieuse 50% en culture (TCID₅₀)

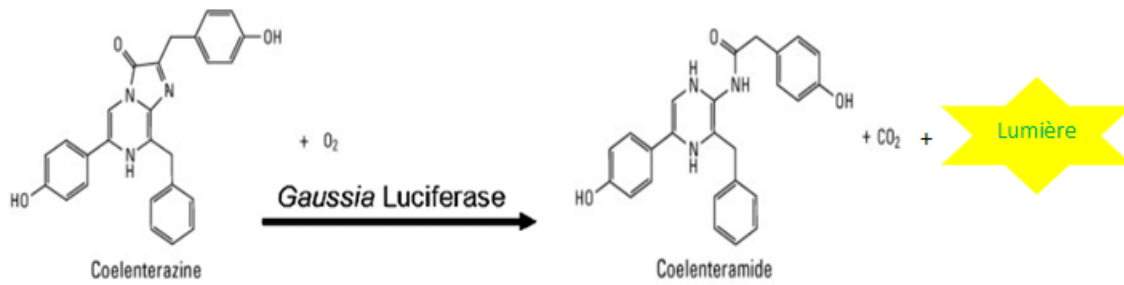
Le titre viral infectieux TCID₅₀ (50% *tissue culture infectious doses*) du surnageant collecté tous les 3 jours après transfection a été déterminé par la méthode de dilution en point final décrite par **Lindenbach (2009)**. Le surnageant a été dilué dix fois en série et 100 µL de chaque dilution ont été utilisés pour infecter les cellules Huh7.5ensemencées à raison de $6,4 \times 10^3$ cellules/puits dans les plaques de 96-puits 24 h plutôt. Après la période d'absorption qui correspond à 4 h, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS et avec du milieu frais pendant 72 h. Le surnageant a été collecté pour mesurer l'activité de la luciférase sécrétée dans le milieu d'incubation et les cellules soumises à l'immunofluorescence pour la détection de la capsid du VHC.

II.2.5.2.1. Mesure de l'activité de la luciférase de *Gaussia princeps*

Elle a été effectuée selon le protocole décrit par **Phan et al. (2009)**.

➤ Principe

Les luciférases sont une classe d'enzymes oxydatives qui permettent aux organismes vivants d'être bioluminescents, c'est-à-dire d'émettre de la lumière. La luciférase de *Gaussia princeps* catalyse la décarboxylation oxydative du colenterazine en colenteramide avec production de la lumière selon l'équation ci-après.



Cette lumière ou bioluminescence peut être détectée et quantifiée à l'aide d'un luminomètre. L'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la quantité de luciférase présente dans l'échantillon et directement corrélée à la réplication virale.

➤ Procédure

La quantification de l'infection virale par la mesure de l'activité de la luciférase sécrétée dans le milieu d'incubation a été réalisée en utilisant le kit de dosage *BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit (New England BioLabs)*. A la fin de l'incubation, le surnageant collecté a été clarifié par centrifugation (16 000g, 5 min, 25°C), puis 16 μ L ont été prélevées et mélangées avec 4 μ L du tampon Renilla 5X lysis Buffer (Promega, Madison, USA) pour éliminer le pouvoir infectieux des particules HCVcc. L'activité relative de la luciférase exprimée en RLU (Relative Light Units) a été mesurée à l'aide du luminomètre GLOMAX™ 20/20 par injection du mélange contenant 20 μ L d'échantillon et 50 μ L du réactif *Gaussia Luciferase solution assay*. Le temps d'intégration du luminomètre a été réglé à 10 secondes.

II.2.5.2.2. Détection de l'infection par immunofluorescence indirecte

Le protocole décrit par **Galani et al. (2016)** a été utilisé.

➤ Principe

L'immunofluorescence indirecte est une technique d'immuno-marquage qui consiste à détecter un antigène viral grâce à un anticorps monoclonal spécifique de cet antigène, puis à révéler cette reconnaissance par une antiglobuline (anticorps secondaire) marquée qui se fixe à l'anticorps monoclonal. Cette antiglobuline peut être marquée par un fluorophore comme la fluorescéine ou le fluorochrome CY3. Une lecture en microscopie à fluorescence permet de visualiser les cellules fluorescentes et de préciser la localisation subcellulaire de l'antigène viral. La technique utilisée ici nous permet de visualiser par fluorescence, les cellules infectées par les particules virales VHCcc.

➤ Procédure

A la fin de la période d'incubation (72 h après inoculation du virus), le milieu d'incubation a été collecté et les cellules ont été fixées à -20°C pendant 15 min dans 100 µL de méthanol, puis décongelées pendant 3 min à température ambiante et le méthanol a été éliminé. Cinquante microlitres de BSA 1% (1 g de BSA dilué dans 100 mL de PBS) ont été ensuite ajoutés dans chaque puits et les cellules incubées pendant 20 min à température ambiante. Après ce temps d'incubation, la solution de BSA a été éliminée par aspiration, puis 50 µL d'anticorps monoclonal *mouse anti-HCV core D95B* (Thermo Fisher Scientific, USA) dilué au 1/500^{ème} dans le BSA 1% ont été ajoutés et les cellules incubées à nouveau à température ambiante pendant 30 min. Après cette incubation, les cellules ont été lavées 3 fois par ajout de 200 µL de PBS pendant 3 min. Puis 50 µL d'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific, USA) dilué au 1/500^{ème} dans le BSA 1% et 25 µL de la solution de DAPI (Molecular Probes, Life Technologies) à 1 µg/mL ont été successivement ajoutés. Les cellules ont été incubées à l'obscurité pendant 30 min suivie de 3 lavages au PBS. Les images ont été prise dans chaque puits à l'aide d'un microscope à

fluorescence (Advanced Microscopy Groups), à l'objectif X 40 avec les paramètres d'exposition 405/450 nm et 561/610 nm.

II.2.5.3. Effet des composés de KgF25 sur la viabilité des cellules Huh7.5

Avant l'évaluation de l'activité antivirale des composés de KgF25, leur effet sur la viabilité des cellules Huh7.5 dans le but de déterminer la concentration maximale non toxique pour les cellules a été évalué. Pour cela, les cellules ont étéensemencées dans les plaques de 96-puits à raison de $6,4 \times 10^3$ cellules/puits et incubées pendant 24 h. Ensuite, le milieu a été éliminé par aspiration et 100 μ L de milieu frais contenant les composés à différentes concentrations (0,1; 1; 10; 50; 100; 500 et 1000 μ M) ou le DMSO 0,2% (témoin) ont été ajoutés. Après 72 h d'incubation, la viabilité des cellules a été évaluée par le test au MTT comme décrit au paragraphe **II.2.4.3.** PP 59.

II.2.5.4. Evaluation de l'activité antivirale des composés de KgF25 sur le cycle infectieux du VHC

L'effet des composés isolés de KgF25 a été examiné sur les étapes clés du cycle infectieux du VHC: l'entrée du virus dans la cellule hôte (fixation du virus à la surface de la cellule hôte), la réplication virale et, l'assemblage/libération de nouveaux virions. Ainsi, Les cellules ont étéensemencées dans les plaques de 96 puits à raison de $6,4 \times 10^3$ cellules/puits et incubées pendant 24 h, dans le milieu DMEM complet. Après ce temps d'incubation, le milieu de culture a été aspiré et les traitements effectués ainsi qu'il suit:

- Pour l'étape d'entrée (fixation), les cellules ont été incubées pendant 4 h en présence de 100 μ L de la suspension virale contenant du DMSO 0,2% (témoin) ou les composés isolés aux concentrations prédéterminés. Après 4 h d'incubation correspondant à la période d'adsorption du virus, le milieu de culture a été remplacé

par du milieu DMEM complet ne contenant ni les composés de KgF25, ni l'inoculum VHCcc et l'incubation s'est poursuivie pendant 72 h.

- Pour l'étape de répllication, les cellules Huh7.5 ont d'abord été infectées avec 100 µL d'inoculum VHCcc pendant 4 h et le milieu a été aspiré. Ensuite, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS et incubées avec 100 µL de milieu DMEM contenant du DMSO 0,2% (témoin) ou les composés isolés aux concentrations prédéterminés pendant 72 h.
- Pour l'étape d'assemblage/libération, le milieu de culture collecté à l'issu des 72 h d'incubation dans l'étape de répllication a été clarifié par centrifugation (16 000 g, 5 min, 25°C) et utilisé comme source extracellulaire de particules VHCcc pour infecter les cellules Huh7.5. Après 4 h d'incubation correspondant à la période d'adsorption du virus par la cellule, le milieu a été éliminé, les cellules lavées 2 fois aux PBS et incubées avec le milieu DMEM complet ne contenant ni les composés de KgF25, ni l'inoculum VHCcc pendant 72 h.

Après ces 72 h d'incubation dans chaque étape, les milieux de culture collectés ont été clarifiés par centrifugation (16 000 g, 5 min, 25°C), puis l'activité de la luciférase sécrétée dans le milieu d'incubation a été mesurée comme décrit au paragraphe **II.2.5.2.1** afin de quantifier le taux d'infection.

II.2.5.5. Analyse de l'effet des composés de KgF25 sur l'expression de quelques protéines impliquées dans les interactions cellule hôte-virus au cours du cycle infectieux du VHC

Afin de mieux comprendre le mécanisme par lequel les composés isolés de KgF25 inhibent le cycle infectieux du VHC, leur effet sur l'expression de quelques protéines impliquées dans les interactions cellule hôte-virus au cours des étapes clés du cycle

infectieux du VHC a été évalué. Pour l'étape d'entrée, l'analyse s'est faite par cytométrie en flux et par le test de blocage et a porté sur l'expression de la protéine CD81, un récepteur d'entrée virale. Pour les étapes de réplication et d'assemblage/libération, l'analyse s'est faite par *Western Blot* et a porté sur l'expression des protéines NS5B, PI4KA et OAS-3 d'une part (étape de réplication) et d'autre part sur l'expression de la protéine DGAT-1 (étape d'assemblage/libération).

II.2.5.5.1. Analyse de l'expression du récepteur CD81 par cytométrie en flux

Le protocole décrit par **Cheng *et al.* (2013)** a été utilisé.

➤ Définition et principe de la technique

La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule ou une cellule coupant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux paramètres morphologiques (taille et granularité) et aux paramètres de fluorescence (liés à l'utilisation de marqueurs fluorescents). Cette technique de caractérisation individuelle (cellule par cellule), quantitative et qualitative peut être couplée à l'immuno-détection qui consiste à détecter une protéine grâce à un anticorps primaire spécifique d'une protéine d'intérêt, puis à révéler cette reconnaissance par une antiglobuline (anticorps secondaire) marquée qui se fixe à l'anticorps primaire. Cette antiglobuline peut être marquée par un fluorochrome comme la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Une analyse en cytométrie de flux ou FACS (*fluorescence-assisted cell sorting*) permet de détecter et quantifier les cellules fluorescentes qui expriment la protéine d'intérêt. La technique utilisée ici nous permet d'analyser par fluorescence, le pourcentage de cellules ayant exprimé le récepteur CD81.

➤ Procédure

Les cellules Huh7.5 ont étéensemencées à raison de 2×10^5 cellules/puits dans les plaques de 12 puits. Le jour suivant, le milieu a été changé et les cellules ont été traitées avec le DMSO 0,2% ou les composés à la concentration prédéterminée pendant 48 h. Les cellules ont été ensuite lavées avec le PBS et détachées avec 100 μ L de Trypsine-EDTA (GIBCO, Life Technologies) et transférées dans un tube Eppendorf. Après lavage par centrifugation (300 g, 5 min, 4°C) avec 1 mL de PBS, les cellules ont été incubées dans la glace pendant 30 min avec 100 μ L d'anticorps monoclonal *rabbit anti-CD81 antibody* (*Beijing Biosynthesis Biotechnology, Beijing, China*) dilué au 1/50^{ème} dans le PBS. Ensuite, les cellules ont été lavées 3 fois avec 1 ml de PBS par centrifugation (300 g, 5 min, 4°C), puis incubées dans la glace et à l'obscurité pendant 30 min avec 100 μ L d'anticorps *FITC-goat anti-rabbit secondary antibody* (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA*) dilué au 1/200^{ème} dans le PBS. Après 3 lavages avec le PBS, les cellules ont été suspendues dans 200 μ L de PBS et analysées avec l'appareil BD FACS Calibur Flow Cytometer couplé au logiciel FlowJo Software.

II.2.5.5.2. Test de blocage du récepteur CD81

Le test de blocage du récepteur CD81 a été réalisé selon la méthode de **Gottwein *et al.* (2007)**.

➤ Principe

Le principe de ce test consiste à prétraiter les cellules Huh7.5 en présence d'un anticorps anti-CD81 ou des composés isolés avant de les soumettre à une infection. Si le prétraitement des cellules se solde par une diminution du taux d'infection comparativement au témoin non traité, alors l'inhibition de l'entrée est attribuée au blocage de ce récepteur.

➤ Procédure

Les cellules Huh7.5 ont étéensemencées à raison $6,4 \times 10^3$ cellules/puits dans les plaques de 96 puits. Après 24 h, le milieu de culture a été remplacé et les cellules incubées avec du DMSO 0,2%, l'anticorps monoclonal de lapin anti-CD81 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou les composés isolés à la concentration prédéterminée pendant 1 h à 37°C avant infection avec la suspension virale pendant 4 h. Ensuite, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS et incubées avec du milieu frais ne contenant ni l'anticorps, ni les composés. Après 72 h d'incubation, le milieu de culture a été collecté pour la quantification du taux d'infection par mesure de l'activité de la luciférase sécrétée dans le milieu d'incubation et les cellules ont été soumises à l'immunofluorescence indirecte pour la détection de la protéine VHC core (capside virale).

II.2.5.5.3. Analyse par *Western Blot* de l'expression des protéines impliquées dans les étapes de réplication et d'assemblage/libération

Les cellules Huh7.5 ont étéensemencées à raison de 2×10^5 cellules/puits dans les plaques de 12 puits. Le jour suivant, le milieu a été changé et les cellules ont été infectées avec l'inoculum VHCcc pendant 4 h. Ensuite, le milieu a été remplacé avec du milieu frais contenant du DMSO (0,2%) ou les composés isolés à la concentration prédéterminée. Le danoprevir (DNV) (*MedChem Express, USA*), un inhibiteur de la protéase virale NS3/NS4A, a été utilisé comme témoin positif et testé à la concentration 0,5 μM . Après 72 h d'incubation, les cellules ont été lavées avec le PBS et lysées avec le tampon RIPA (*Radio-Immuno-Precipitation Assay*) (*Beyotime Biotechnology, Beijing, Chine*) contenant 0,2% de *Halt protease inhibitors cocktail EDTA-free 100X* (*Thermo Fisher Scientific, USA*). Le lysat cellulaire a été centrifugé (15 000g, 15 min, 4°C) et la teneur en protéines dans le surnageant a été déterminée à l'aide du kit *BCA Assay Kit* (*Thermo Fisher Scientific, USA*); puis 50 μg de

protéines ont été analysés par *Western Blot* comme décrit au paragraphe **II.2.4.7.1** en utilisant les anticorps primaires (dilués au 1/1000^{ème}) suivants: *Rabbit polyclonal anti-HCV NS5B* (*GeneTex, Ca, USA*), anti-DGAT-1, anti-PI4KA et anti-OAS-3 (*Beijing Biosynthesis Biotechnology, Beijing, China*).

II.2.6. Analyses statistiques

Les expériences ont été réalisées en triples et les données exprimées sous forme de moyennes \pm écarts-types (ET). L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad prism 5.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). Les comparaisons des moyennes ont été effectuées entre les groupes traités et les groupes non traités. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances à un facteur (ANOVA). Pour les groupes ayant présenté une différence significative entre les variances, les moyennes ont été comparées par le post-hoc test de Bonferroni. Le seuil de probabilité $p < 0,05$ a été considéré comme statistiquement différent.



CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Résultats

III.1.1. Caractéristiques des composés isolés de la fraction KgF25 de *K. grandifoliola*

III.1.1.1. Chromatogramme HPLC des sous-fractions actives, des composés purs et analyse des spectres d'absorption

Les figures 28 et 29 ci-après présentent respectivement les chromatogrammes HPLC des sous-fractions actives, les chromatogrammes et les structures chimiques des composés purifiés.

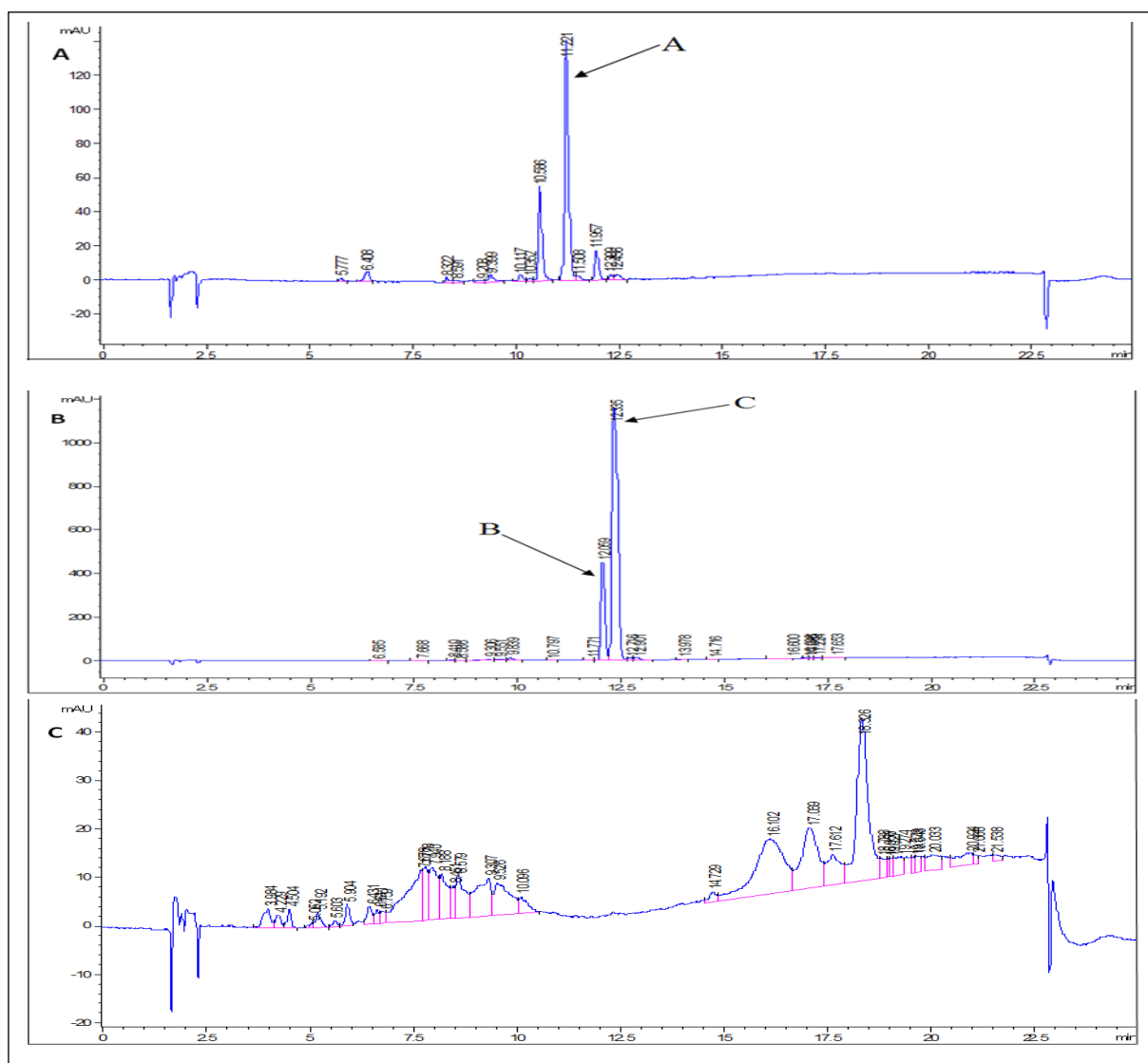


Figure 28: Chromatogramme HPLC des sous-fractions actives sélectionnées

A, B et C: Chromatogrammes respectifs des sous-fractions KgF25sf1, KgF25sf2 et KgF25sf3 analysées par HPLC-ACN-Standard-Method. KgF25: fractions au chlorure de méthylène/méthanol (75:25, v/v) de K. grandifoliola; KgF25sf1: sous-fraction 1 de KgF25; KgF25sf2: sous-fraction 2 de KgF25; KgF25sf3: sous-fraction 3 de KgF25.

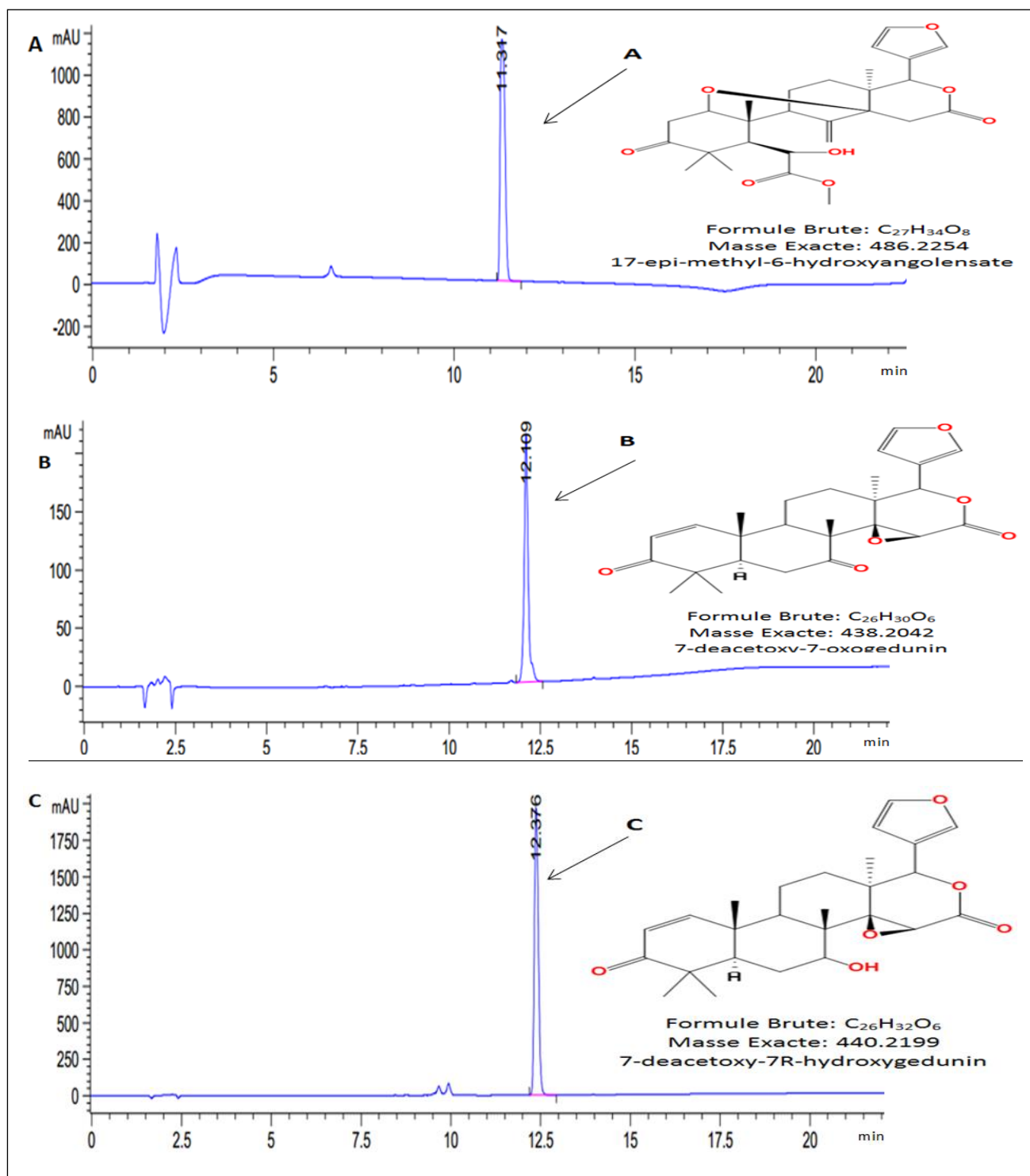


Figure 29: Chromatogramme HPLC et structures chimiques des composés purifiés

A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; **B:** 7-deacetoxy-7-oxogedunin; **C:** 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin. Les composés ont été purifiés par HPLC-ACN-Standard-Purify-Method. Leurs masses exactes et leurs structures chimiques ont été déterminées SMHR et RMN 1H et ^{13}C respectivement.

Le chromatogramme HPLC de KgF25sf1 (figure 28A) a montré plusieurs pics avec des temps de rétention variables. Le pic le plus élevé (temps de rétention: 11,22 min) a été

désigné comme composé A (C-A). Le chromatogramme HPLC de KgF25sf2 (figure 28B) a montré deux principaux pics avec des temps de rétention de 12,05 et 12,33 min et ont été désignés comme composé B (C-B) et composé C (C-C) respectivement. C-A, C-B et C-C ont été purifiés et caractérisés. L'analyse de leurs spectres SMHR et RMN (Annexe 1) a permis l'identification sans ambiguïté de trois limonoïdes connus (figure 29) comme 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate, 7-deacetoxy-7-oxogedunin et 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin respectivement pour C-A, C-B et C-C.

Le chromatogramme HPLC de KgF25sf3 (figure 28C) a montré de nombreux pics qui ont été purifiés, mais n'ont pas fait l'objet d'une caractérisation en RMN car les masses obtenues étaient nettement inférieures à la masse requise (5 mg) pour effectuer une analyse en RMN.

III.1.1.2. Effet anti-hépatotoxique des sous-fractions actives et des composés isolés de la fraction KgF25 de *K. grandifoliola* contre la toxicité induite par le CCl₄/cisplatine/APAP

III.1.1.2.1. Concentrations létales du CCl₄/cisplatine/APAP

L'exposition des hépatocytes L-02 pendant 36 h au CCl₄ (figure 30A et 30B), ou au cisplatine (figure 30C et 30D) ou à l'APAP (figure 30E et 30F) a provoqué de manière concentration-dépendante une diminution significative ($p < 0,05$) de la viabilité cellulaire et une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité de l'ALAT libérée dans le milieu d'incubation. Les concentrations létales 50 (CL₅₀) ont été de $14,67 \pm 3,55$ mM; $19,66 \pm 2,24$ μ M et $9,80 \pm 2,61$ mM respectivement pour le CCl₄, le cisplatine et l'APAP. Ainsi, pour la suite des expériences, les concentrations de 15 mM, 20 μ M et 10 mM ont été choisies comme concentration toxique dans les modèles d'hépatotoxicité induites respectivement par le CCl₄, le cisplatine et l'APAP.

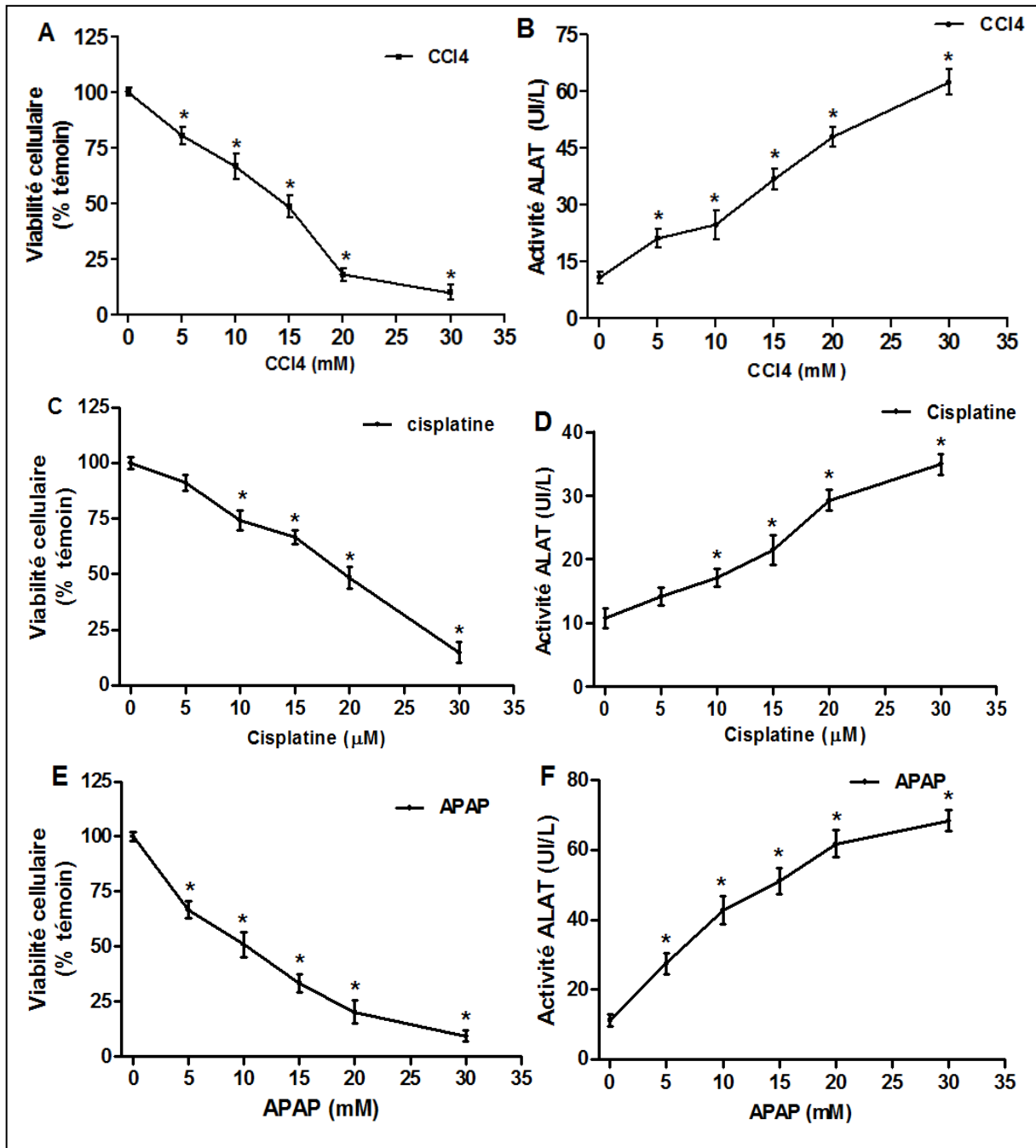


Figure 30: Baisse de la viabilité cellulaire et augmentation de l'activité extracellulaire de l'ALAT des hépatocytes L-02 intoxiqués au CCl₄/Cisplatine/APAP

Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de CCl₄/APAP (5-30 mM) ou de cisplatine (5-30 μ M) pendant 36 h. **A, C et E:** Baisse de la viabilité cellulaire indiquant respectivement la toxicité concentration-dépendante du CCl₄, du cisplatine et de l'APAP. **B, D et F:** Augmentation de l'activité de l'ALAT dans le milieu d'incubation indiquant la perte de l'intégrité membranaire dans les hépatocytes L-02 intoxiqués respectivement au CCl₄, au cisplatine et à l'APAP. Les valeurs sont les moyennes \pm écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. *Valeurs significativement ($P < 0,05$) différentes comparées au témoin (0 mM) par le test de Bonferroni.

III.1.1.2.2. Viabilité des hépatocytes L-02 en présence des sous-fractions de KgF25 et après induction de la toxicité par le CCl₄/cisplatine/APAP

➤ Viabilité des hépatocytes L-02 en présence des sous-fractions de KgF25

Avant le criblage de l'activité anti-hépatotoxique des sous-fractions de KgF25, leur effet cytotoxique a été analysé en incubant les cellules pendant 36 h en présence de ces sous-fractions à la concentration de 500 µg/mL. L'observation des résultats du test de viabilité au MTT (figure 31A) et du dosage de l'activité de l'ALAT (figure 31B) dans le milieu d'incubation ne montre aucune différence significative ($p > 0,05$) entre le groupe témoin et les groupes traités; indiquant ainsi que les sous-fractions de KgF25 ne sont pas toxiques pour les hépatocytes L-02 à la concentration testée.

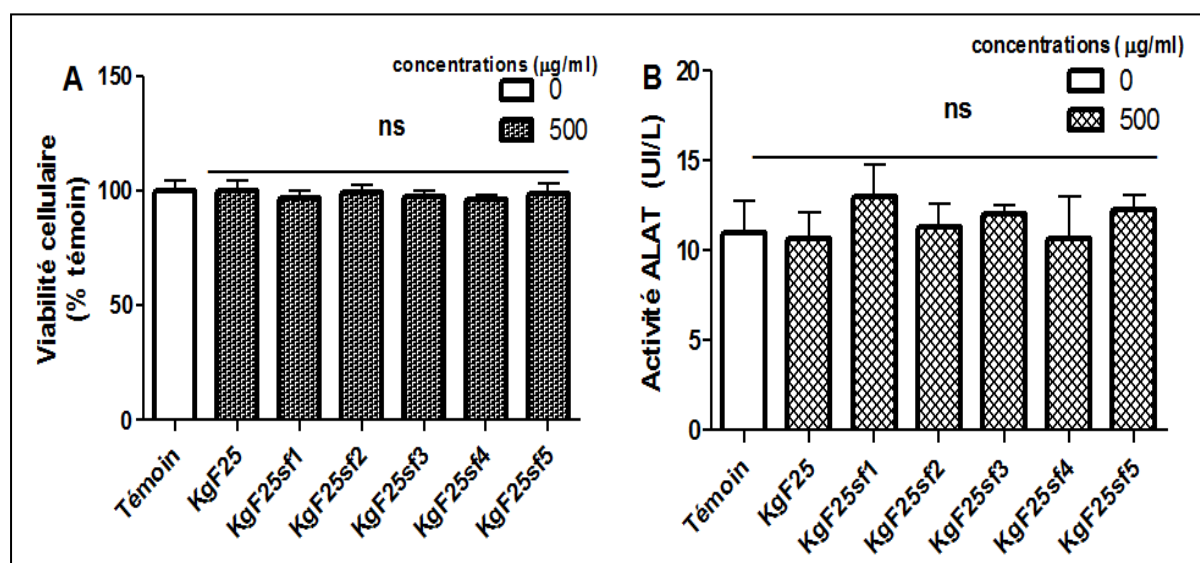


Figure 31: Viabilité cellulaire et activité de l'ALAT dans le milieu d'incubation des hépatocytes L-02 en présence des sous-fractions de KgF25

Les cellules ont été incubées en présence des différentes sous-fractions de KgF25 (500 µg/mL) pendant 36 h. Ensuite, la viabilité cellulaire (A) et l'activité de l'ALAT (B) libérée dans le milieu d'incubation ont été déterminées. Les valeurs sont les moyennes \pm écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^{ns}Valeurs significativement non différentes ($P > 0,05$) comparées au témoin (0 µg/mL) par le test de Bonferroni. KgF25: fractions au chlorure de méthylène/méthanol (75:25, v/v) de *K. grandifoliola*; KgF25sf1: sous-fraction 1 de KgF25; KgF25sf2: sous-fraction 2 de KgF25; KgF25sf3: sous-fraction 3 de KgF25; KgF25sf4: sous-fraction 3 de KgF25; KgF25sf5: sous-fraction 5 de KgF25.

➤ Viabilité des hépatocytes L-02 en présence des sous-fractions de KgF25 après induction de la toxicité par le CCl₄/cisplatine/APAP

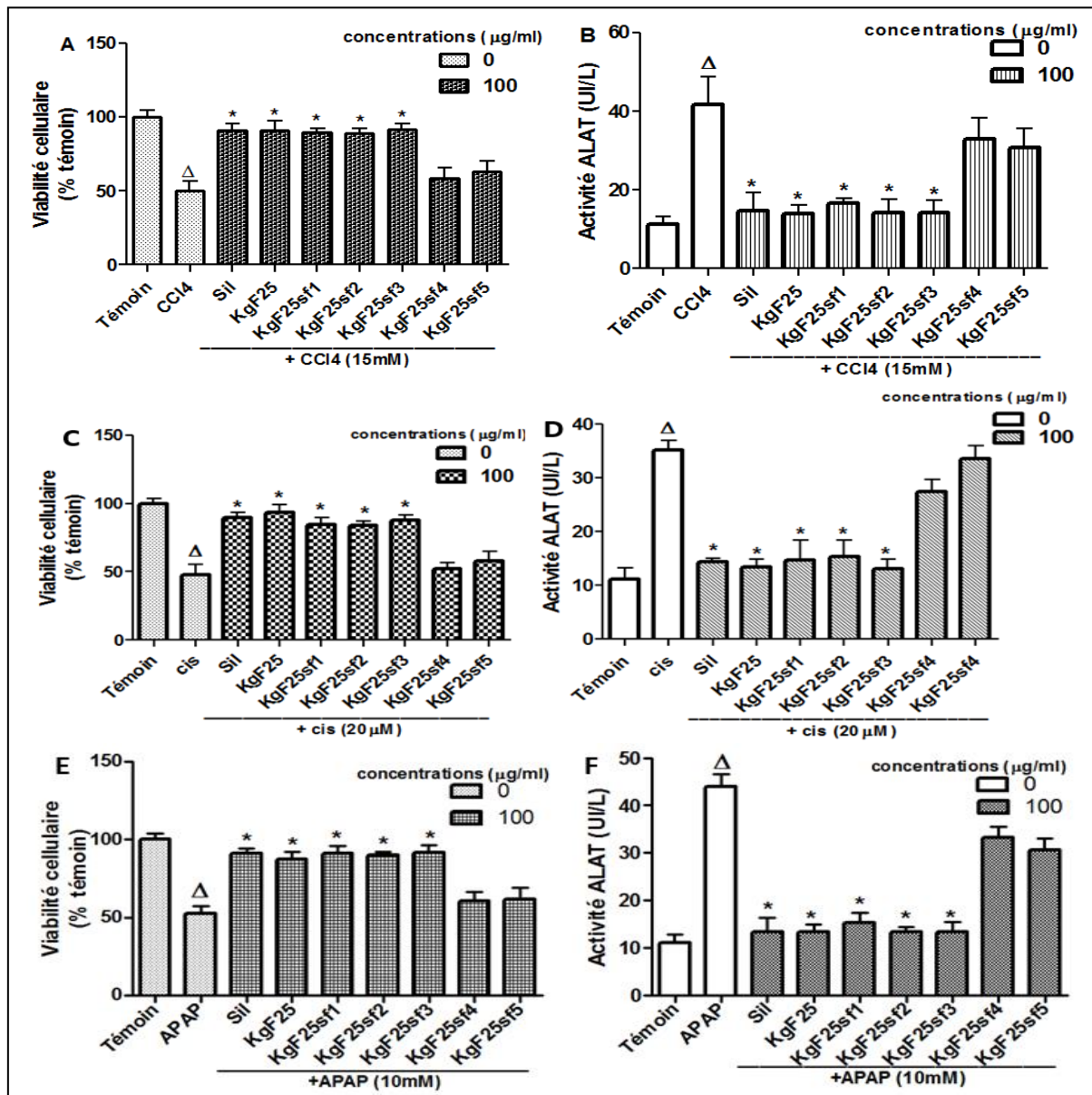


Figure 32: Maintien de la viabilité cellulaire et inhibition de la sortie de l'ALAT des hépatocytes L-02 intoxiqués au CCl₄/cisplatine/APAP par certaine sous fractions de KgF25

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec le CCl₄ (15 mM)/cisplatine (20 μM)/APAP (10 mM), ou co-traitées avec le CCl₄/cisplatine/APAP et les sous-fractions de KgF25 ou la silymarine (100 μg/mL) pendant 36 h. Après le traitement, la viabilité cellulaire (A), (C) et (E) et l'activité de l'ALAT (B), (D) et (F) libérée dans le milieu d'incubation ont été déterminées respectivement dans les cellules intoxiquées au CCl₄, au cisplatine et à l'APAP. Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^ΔValeurs significativement différentes (P < 0,05) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes (P < 0,05) comparées au groupe intoxiqué (CCl₄) par le test de Bonferroni. Sil: silymarine; KgF25: fractions au chlorure de méthylène/méthanol (75:25, v/v) de *K. grandifoliola*; KgF25sf1: sous-fraction 1 de KgF25; KgF25sf2: sous-fraction 2 de KgF25; KgF25sf3: sous-fraction 3 de KgF25; KgF25sf4: sous-fraction 3 de KgF25; KgF25sf5: sous-fraction 5 de KgF25.

Comme présenté sur les figures 32A et 32B, 32C et 32D, 32E et 32F ci-dessus respectivement pour leurs effets contre la toxicité du CCl₄, du cisplatine et de l'APAP, les sous-fractions KgF25sf1, KgF25sf2 et KgF25sf3 ont significativement ($p < 0,05$) maintenu la viabilité cellulaire et inhibé la sortie de l'ALAT des cellules. Ces effets étaient statistiquement non différents de ceux observés dans les cellules traitées avec la silymarine, utilisée ici comme composé hépato-protecteur de référence. Ces sous-fractions étant les plus actives, ont été sélectionnées pour la suite de notre étude et ont fait l'objet d'une analyse HPLC.

III.1.1.2.3. Effet des sous-fractions actives et des limonoïdes isolés à différentes concentrations contre la toxicité induite dans les hépatocytes L-02 par le CCl₄/cisplatine/APAP

L'incubation des cellules uniquement en présence du CCl₄ (15 mM)/cisplatine (20 µM)/APAP (10 mM) pendant 36 h a provoqué la baisse significative ($p < 0,05$) de la viabilité cellulaire (figures 33A, 35A et 37A) couplée à une augmentation de l'activité de l'ALAT (figures 33B, 35B et 37B) dans le milieu d'incubation. Quand les hépatocytes ont été traités avec les sous-fractions actives ou la silymarine aux concentrations: 25; 50 et 100 µg/mL, un effet protecteur concentration-dépendant sur la viabilité cellulaire (figures 33A, 35A et 37A) et inhibiteur concentration-dépendant de la sortie de l'ALAT (figures 33B, 35B et 37B) ont été observés. De même, un effet similaire sur ces paramètres (figures 34A et 34B; 36A et 36B ; 38A et 38B) a été observé lorsque les cellules ont été traitées avec les limonoïdes (10; 20 et 40 µM) ou le JNK inhibiteur. (5; 10; 15 et 20 µM).

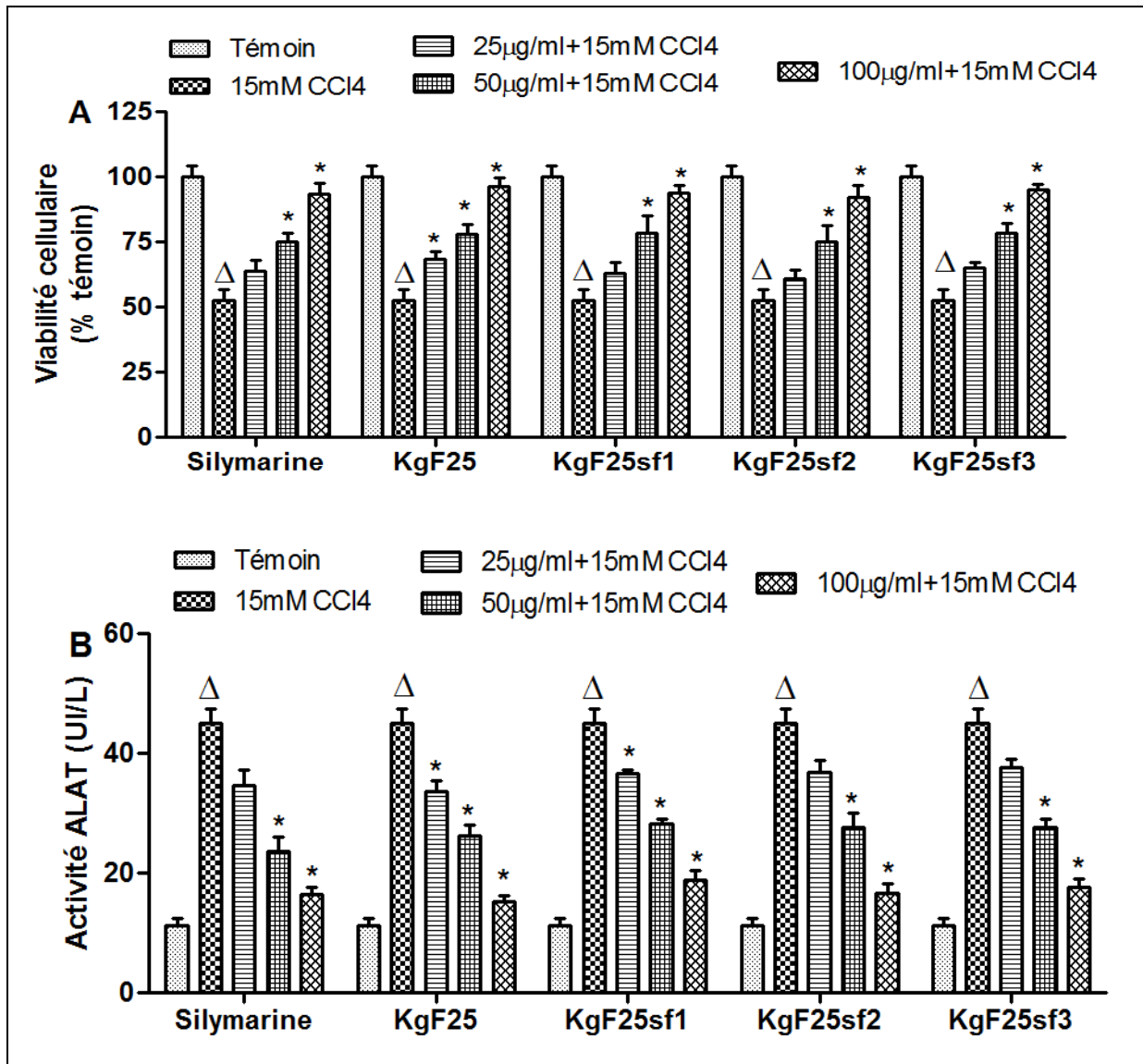


Figure 33: Effet protecteur des sous-fractions actives de KgF25 contre la toxicité du CCl₄

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec le CCl₄ (15 mM), ou co-traitées avec le CCl₄ et les sous-fractions de KgF25 ou la silymarine (25;50 et 100 µg/mL) pendant 36 h. Après le traitement, la viabilité cellulaire (A) et l'activité de l'ALAT (B) libérée dans le milieu d'incubation ont été déterminées. Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^ΔValeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe intoxiqué (CCl₄) par le test de Bonferroni. Sil: silymarine; KgF25: fractions au chlorure de méthylène/méthanol (75:25, v/v) de *K. grandifoliola*; KgF25sf1: sous-fraction 1 de KgF25; KgF25sf2: sous-fraction 2 de KgF25; KgF25sf3: sous-fraction 3 de KgF25.

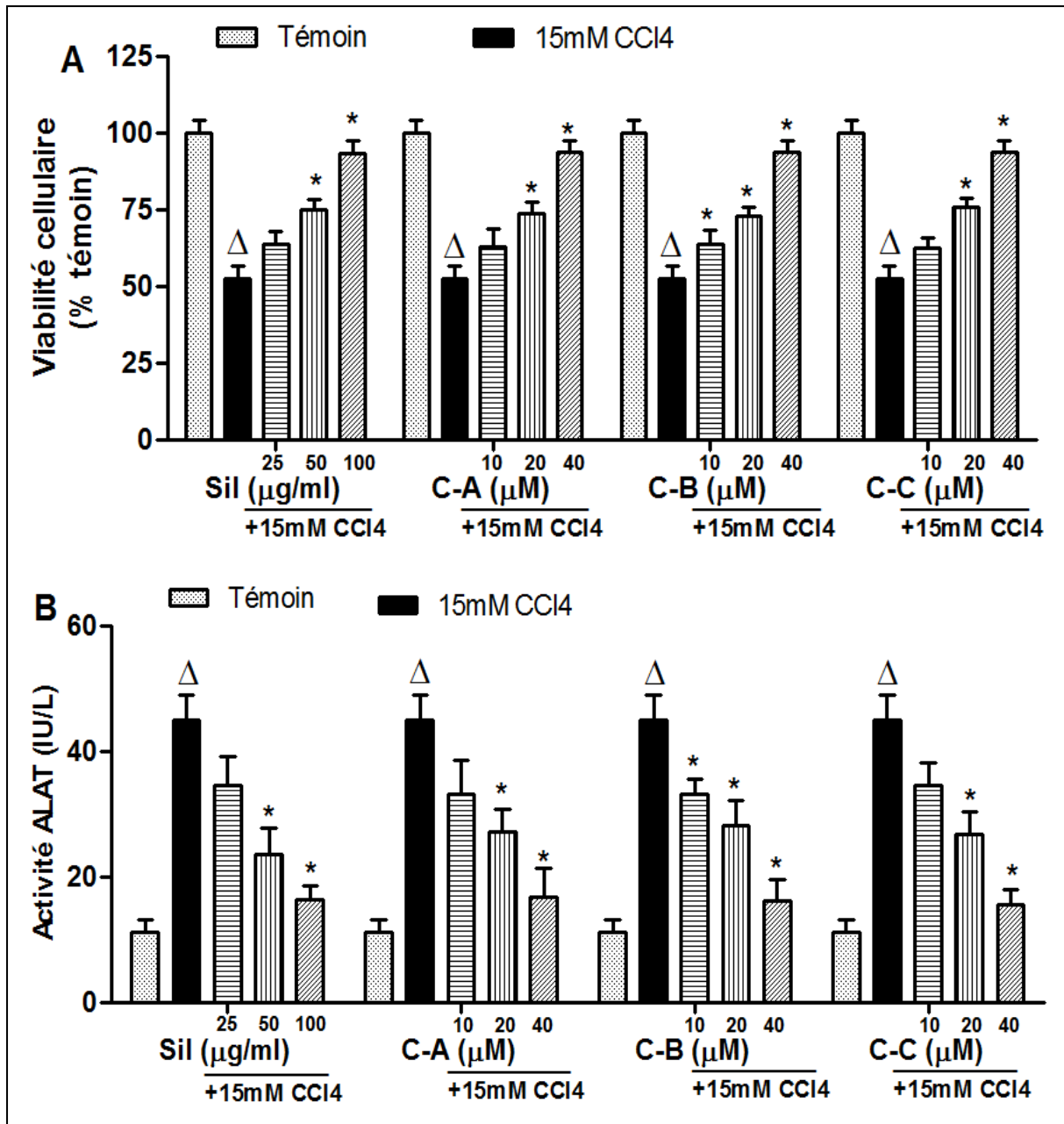


Figure 34: Effet protecteur des limonoïdes isolés contre la toxicité du CCl₄

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec le CCl₄ (15 mM), ou co-traitées avec le CCl₄ et les limonoïdes isolés (10; 20 et 40 µM) ou la silymarine (25;50 et 100 µg/mL) pendant 36 h. Après le traitement, la viabilité cellulaire (A) et l'activité de l'ALAT (B) libérée dans le milieu d'incubation ont été déterminées. Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^AValeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe intoxiqué (CCl₄) par le test de Bonferroni. Sil: silymarine; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

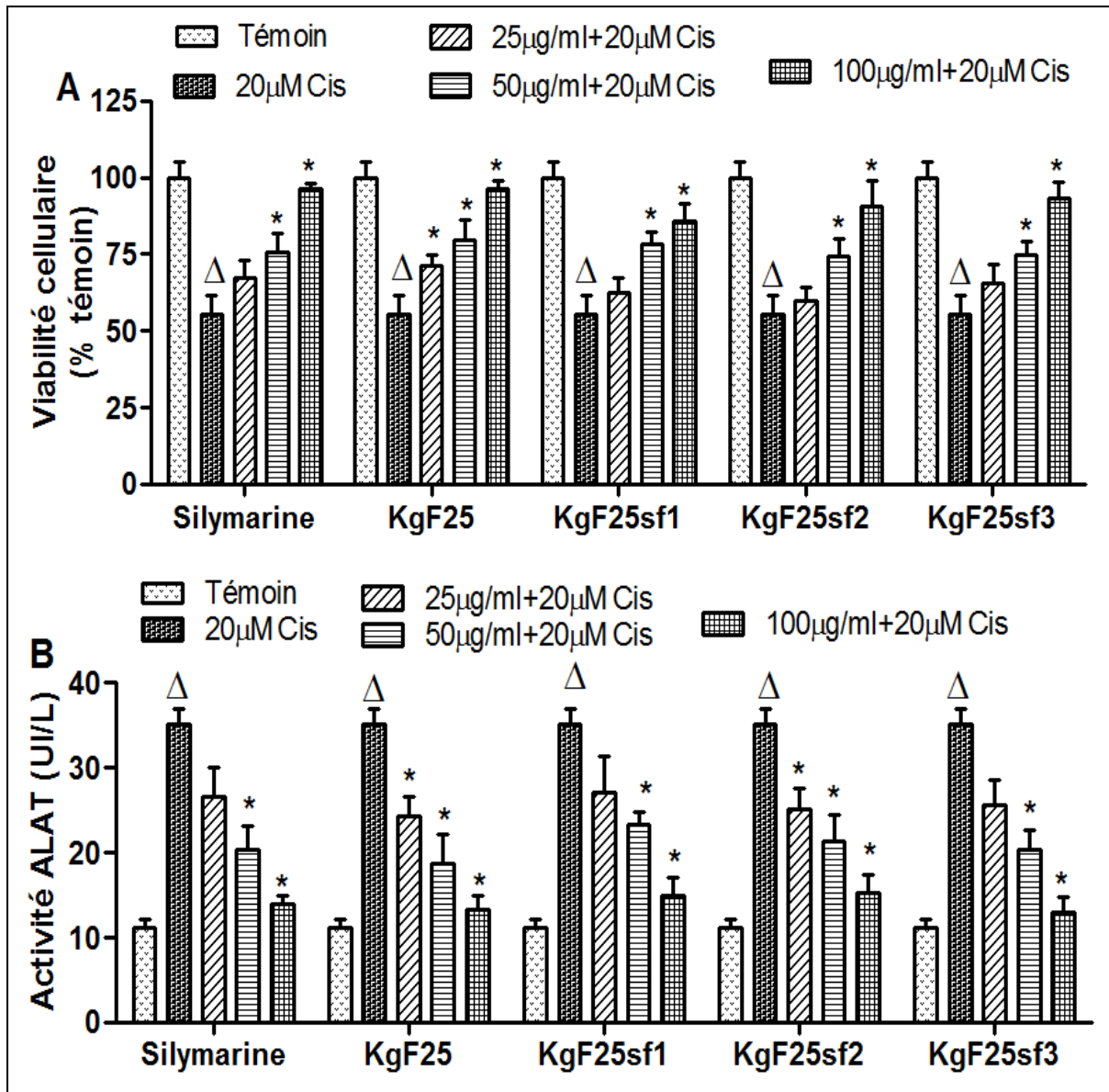


Figure 35: Effet protecteur des sous-fractions actives de KgF25 contre la toxicité induite par le cisplatine

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec le cisplatine (20 µM), ou co-traitées avec le cisplatine et les sous-fractions de KgF25 ou la silymarine (25;50 et 100 µg/mL) pendant 36 h. Après le traitement, la viabilité cellulaire (A) et l'activité de l'ALAT (B) libérée dans le milieu d'incubation ont été déterminées. Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^ΔValeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe intoxiqué (cisplatine) par le test de Bonferroni. Cis: cisplatine; Sil: silymarine; KgF25: fractions au chlorure de méthylène/méthanol (75:25, v/v) de *K. grandifoliola*; KgF25sf1: sous-fraction 1 de KgF25; KgF25sf2: sous-fraction 2 de KgF25; KgF25sf3: sous-fraction 3 de KgF25.

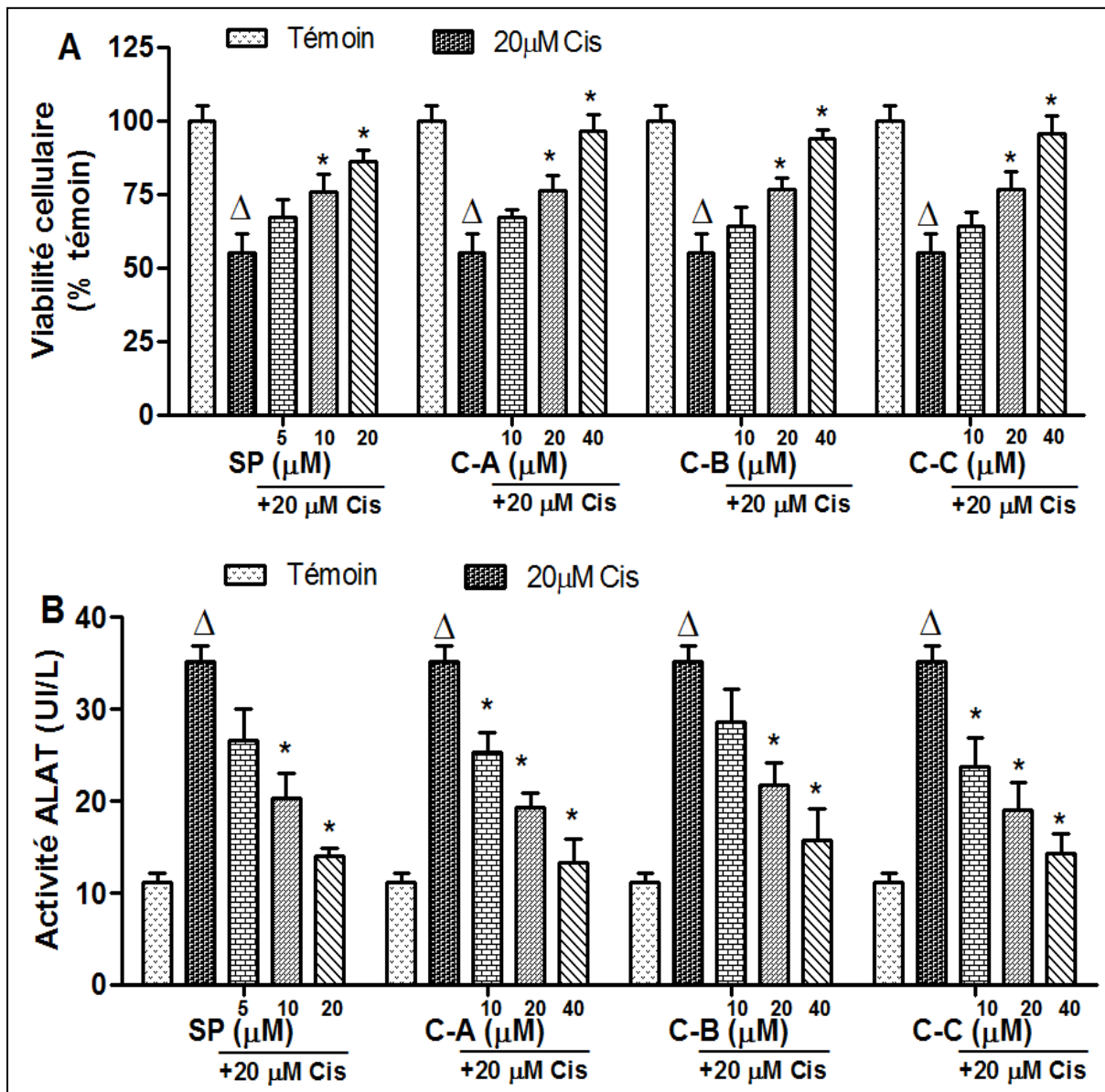


Figure 36: Effet protecteur des limonoïdes isolés contre la toxicité induite par le cisplatine.

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec le cisplatine (20 µM), ou co-traitées avec le cisplatine et les limonoïdes isolés (10; 20 et 40 µM) ou le JNK inhibiteur SP600125 (5; 10 et 20 µM) pendant 36 h. Après le traitement, la viabilité cellulaire (A) et l'activité de l'ALAT (B) libérée dans le milieu d'incubation ont été déterminées. Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^ΔValeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe intoxiqué (cisplatine) par le test de Bonferroni. Cis: cisplatine; SP: JNK inhibiteur SP600125; C-A: 17-epi-méthyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacétoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacétoxy-7R-hydroxygedunin.

Concernant le toxique APAP particulièrement, les concentrations efficaces 50 (CE₅₀) ont été de 19,04 ± 3,42 µM, 20,89 ± 3,68 µM, 17,40 ± 2,79 µM et 13,76 ± 2,37 µM respectivement pour le composé A (17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate), le composé B (7-deacetoxy-7-oxogedunin), le composé C (7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin) et le JNK inhibitor SP600125. Bien que la CE₅₀ du JNK inhibitor SP600125 ait été inférieur à celles des limonoïdes isolés, le JNK inhibitor a offert une protection partielle (viabilité cellulaire = 85,66 ± 3,51%) tandis que la protection a été presque totale (viabilité cellulaire ≥ 95%) lorsque les limonoïdes ont été testé à 40 µM comme confirmé par la coloration des cellules mortes à l'iodure de propidium (PI) (figure 39).

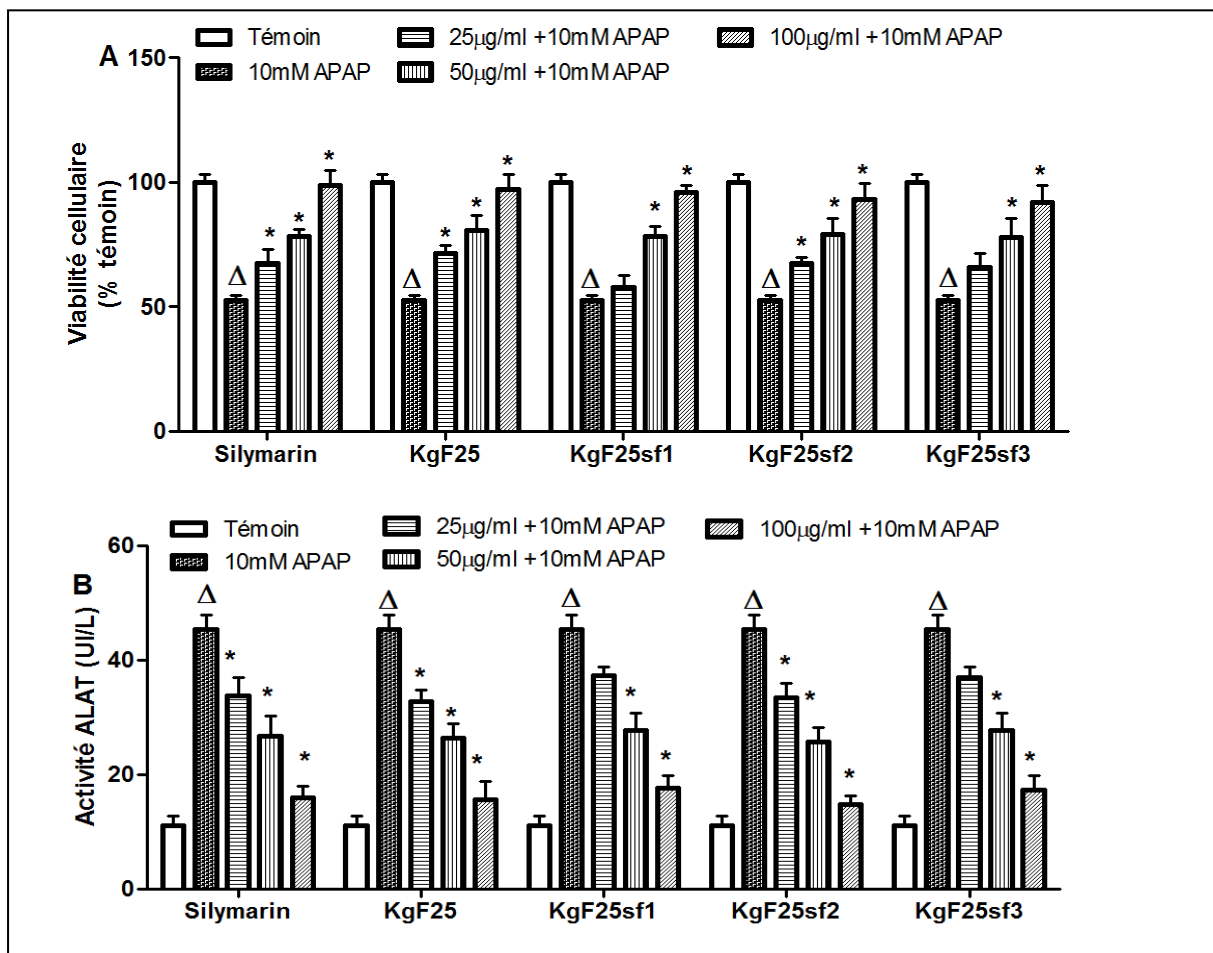


Figure 37: Effet protecteur des sous-fractions actives de KgF25 contre la toxicité induite par l'APAP

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec l'APAP (10 mM), ou co-traitées avec l'APAP et les sous-fractions de KgF25 ou la silymarine (25;50 et 100 µg/mL) pendant 36 h. Après le traitement, la viabilité cellulaire (A) et l'activité de l'ALAT (B) libérée dans le milieu d'incubation ont été

déterminées. Les valeurs sont les moyennes \pm écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^AValeurs significativement différentes ($P < 0,05$) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes ($P < 0,05$) comparées au groupe intoxiqué (APAP) par le test de Bonferroni. Sil: silymarine; KgF25: fractions au chlorure de méthylène/méthanol (75:25, v/v) de *K. grandifoliola*; KgF25sf1: sous-fraction 1 de KgF25; KgF25sf2: sous-fraction 2 de KgF25; KgF25sf3: sous-fraction 3 de KgF25.

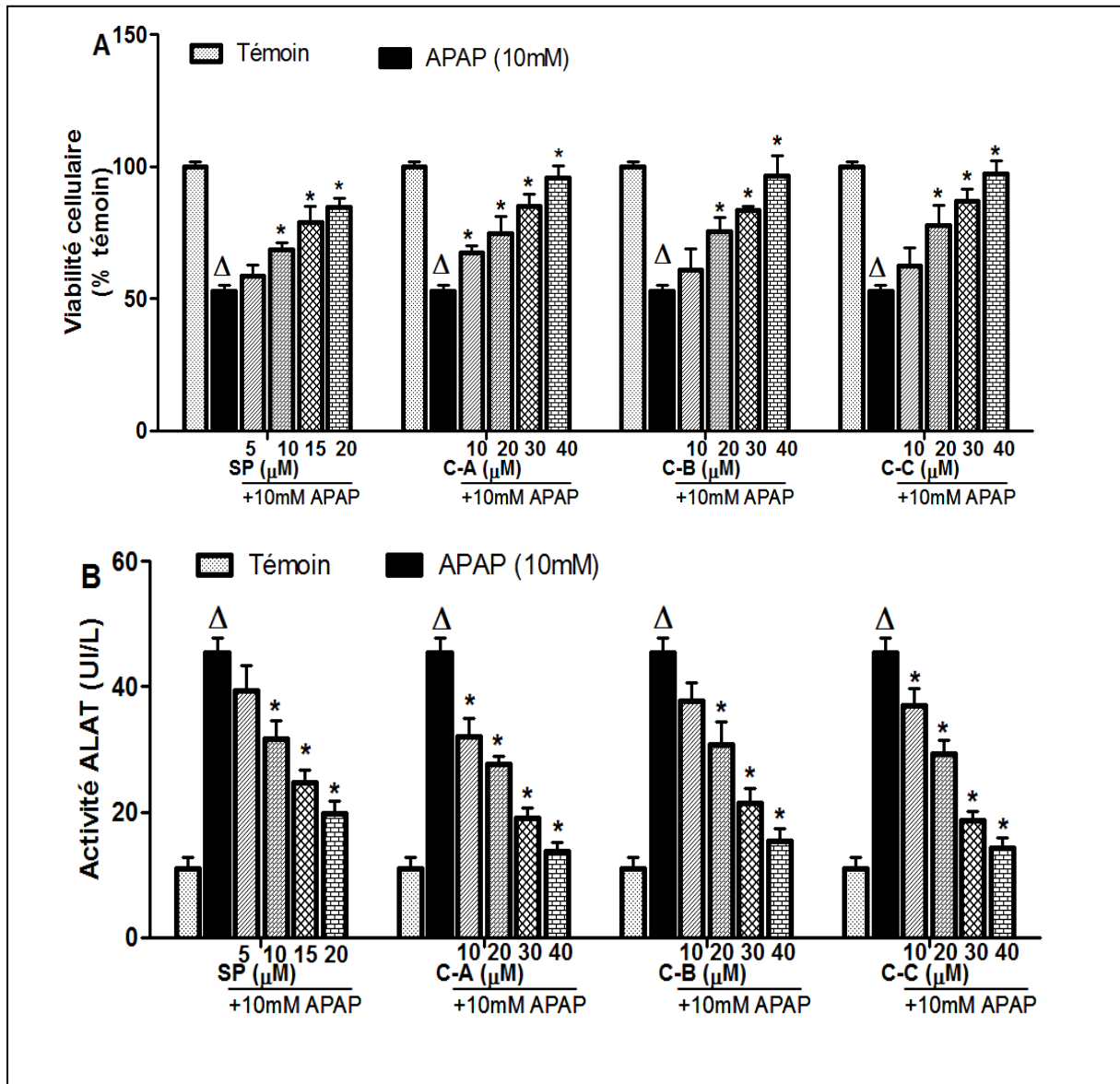


Figure 38: Effet protecteur des limonoïdes isolés contre la toxicité induite par l'APAP

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec l'APAP (10 mM), ou co-traitées avec l'APAP et les limonoïdes isolés (10; 20; 30 et 40 μM) ou le JNK inhibitor SP600125 (5;10;15 et 20 μM) pendant 36 h. Après le traitement, la viabilité cellulaire (A) et l'activité de l'ALAT (B) libérée dans le milieu d'incubation ont été déterminées. Les valeurs sont les moyennes \pm écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^AValeurs significativement différentes ($P < 0,05$) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes ($P < 0,05$) comparées au groupe intoxiqué (APAP) par le test de Bonferroni. SP: JNK inhibitor SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

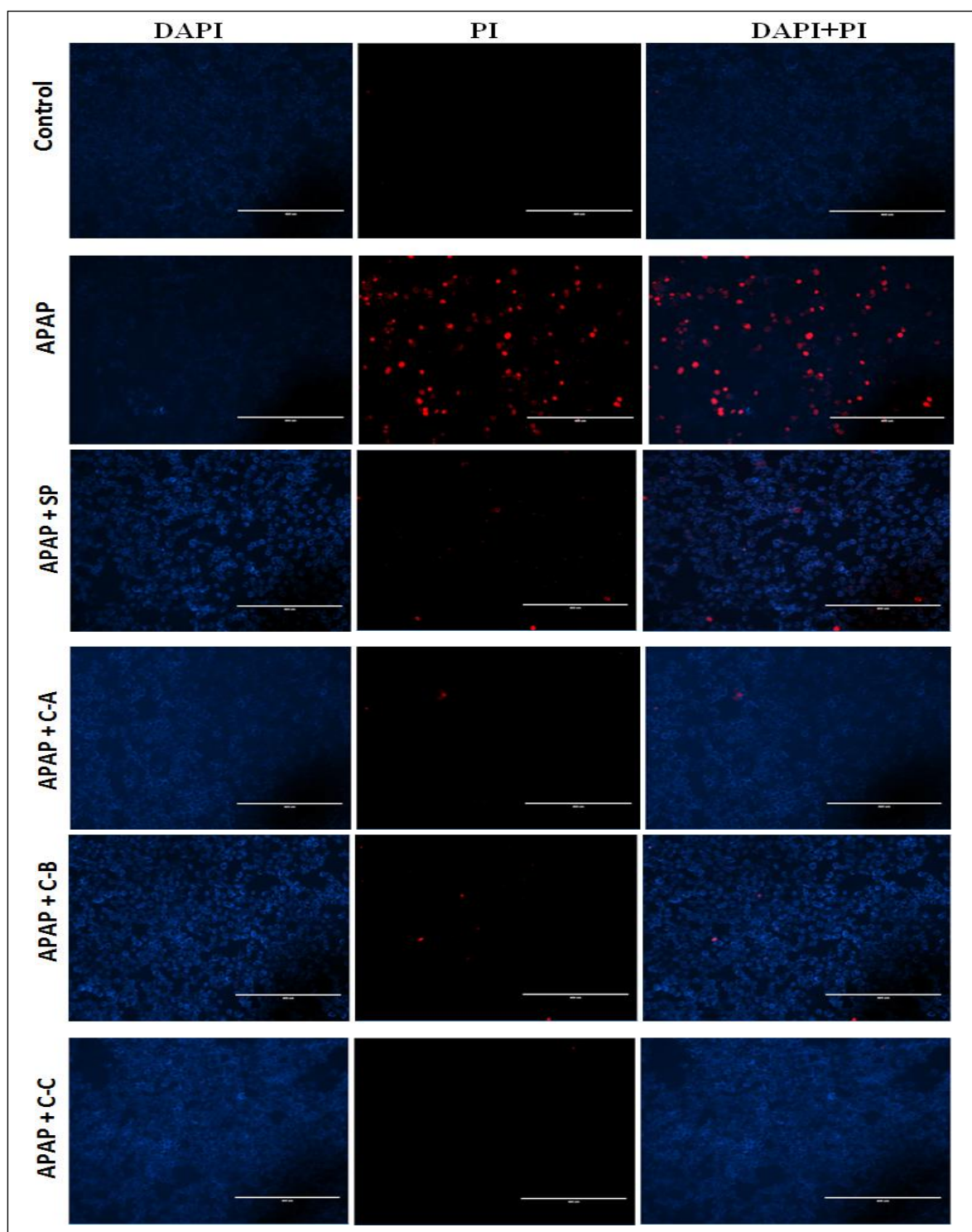


Figure 39: Coloration au PI et DAPI montrant l'effet protecteur des limonoïdes isolés de KgF25 contre la toxicité induite par l'APAP

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec l'APAP (10 mM), ou co-traitées avec l'APAP et les limonoïdes isolés (40 μ M) ou le JNK inhibitor SP600125 (20 μ M) pendant 36 h. Après le traitement, les cellules mortes sont colorées en rouge par le PI et toutes les cellules (vivantes ou mortes) sont colorées en bleu par le DAPI. Chaque expérience a été faite trois fois et les images enregistrées avec le microscope à fluorescence. SP: JNK inhibitor SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin. PI: iodure de propidium ; DAPI : 4',6'-diamino-2-phenylindole.

Quel que soit le modèle d'hépatotoxicité utilisé, quand les sous-fractions actives ou les composés isolés ont été ajoutés aux concentrations respectives de 100 µg/mL ou 40 µM, la viabilité des hépatocytes n'a pas été statistiquement différente de celle des cellules du groupe témoin et le niveau d'activité extracellulaire de l'ALAT était faible. Sur la base de ces observations, ces concentrations ont été choisies pour la suite de nos expériences.

III.1.1.2.4. Conclusion partielle 1

Au terme de cette première partie de notre travail dont l'objectif était d'isoler les composés actifs présents dans la fraction active KgF25, il ressort que trois composés actifs responsable des activités anti-hépatotoxiques appartenant à la famille des limonoïdes et connus sous le nom de 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate, 7-deacetoxy-7-oxogedunin et 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin ont été isolés de la fraction active KgF25.

III.1.2. Effet des limonoïdes isolés sur l'expression des gènes des facteurs moléculaires promoteurs de l'hépatotoxicité et ceux protecteurs des hépatocytes lors du développement de l'hépatotoxicité induite par le CCl₄/Cisplatine/APAP

III.1.2.1. Expression du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) dans les hépatocytes intoxiqués au CCl₄ et à l'APAP et traités par les sous-fractions et les limonoïdes isolés de KgF25

La figure 40 ci-après présente l'expression du CYP2E1 après traitement des cellules avec le CCl₄ (15 mM) ou l'APAP (10 mM) et les sous-fractions actives (100 µg/mL) ou les composés isolés (40 µM). L'induction de l'expression du CYP2E1 suite à l'administration du CCl₄ (figures 40A et 40C) ou de l'APAP (figures 40E et 40G) a significativement ($p < 0,05$) été inhibée lorsque les cellules ont été traitées avec les sous-fractions actives ou les composés isolés. Cet effet était comparable à celui observé dans les cellules traitées avec la silymarine à 100 µg/mL.

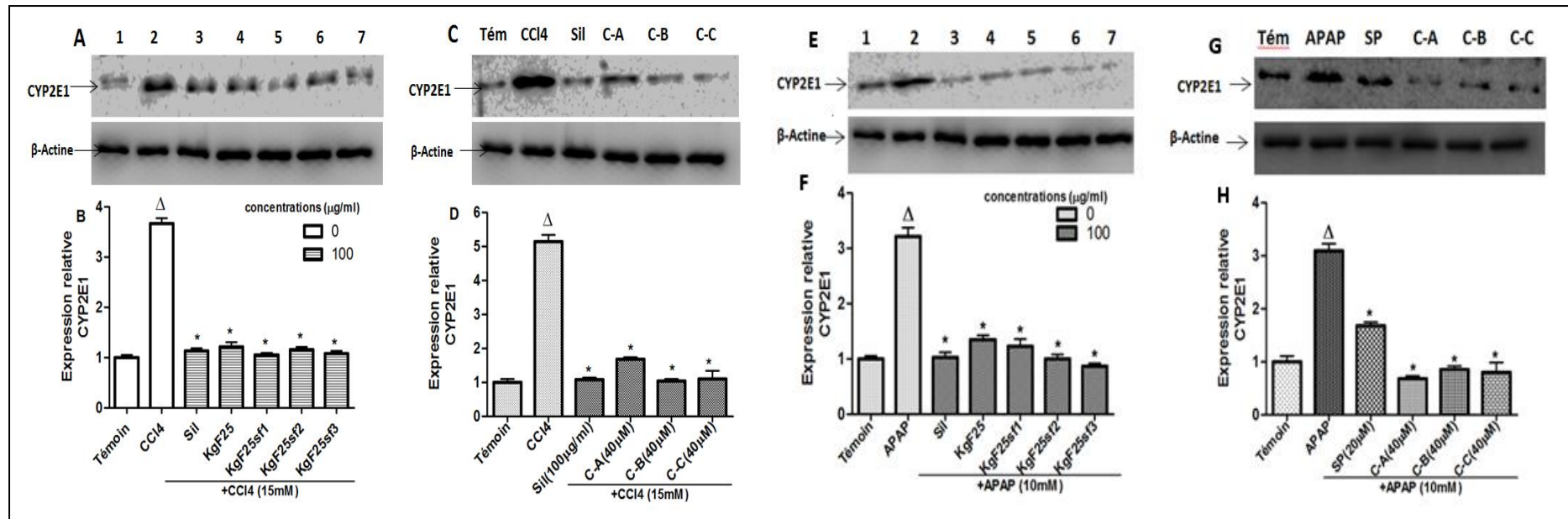


Figure 40: Effet inhibiteur des sous-fractions actives et des composés isolés de KgF25 sur l'expression du CYP2E1 dans les hépatocytes intoxiqués au CCl₄/APAP

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec le CCl₄ (15 mM)/APAP (10 mM), ou co-traitées avec le CCl₄/APAP et les sous fractions actives ou la silymarine (100 µg/mL) ou les limonoïdes isolés (40 µM) ou le JNK inhibiteur SP600125 pendant 6 h. Après traitement, les protéines totales ont été extraites et l'expression du CYP2E1 a été déterminée par western blot. L'expression de la β-actine a été utilisée comme contrôle interne. **A et C**: effet inhibiteur des sous-fractions actives et des composés isolés sur l'expression du CYP2E1 dans les hépatocytes intoxiqués au CCl₄ respectivement. **B et D**: analyse densitométrique des bandes protéiques respectivement pour les sous-fractions et les composés isolés. **E et G**: effet inhibiteur des sous-fractions actives et des composés isolés sur l'expression du CYP2E1 dans les hépatocytes intoxiqués au APAP respectivement. **F et H**: analyse densitométrique des bandes protéiques respectivement pour les sous-fractions et les composés isolés. Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^ΔValeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe intoxiqué (CCl₄/APAP) par le test de Bonferroni. Ligne1: Témoin; Ligne2: CCl₄/APAP; Ligne3: Sil+CCl₄/APAP; Ligne4: KgF25+ CCl₄/APAP; Ligne5: KgF25sf1+ CCl₄/APAP; Ligne6: KgF25sf2+ CCl₄/APAP; Ligne7: KgF25sf3+ CCl₄/APAP. Tém: témoin; Sil: silymarine; KgF25: fractions au chlorure de méthylène/méthanol (75:25, v/v) de *K. grandifoliola*; KgF25sf1: sous-fraction 1 de KgF25; KgF25sf2: sous-fraction 2 de KgF25; KgF25sf3: sous-fraction 3 de KgF25. SP: JNK inhibiteur SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

III.1.2.2. Taux de glutathion (GSH), d'espèces oxygénées réactives (EOR) intracellulaire et du malondialdéhyde (MDA) dans les hépatocytes L-02 intoxiqués au CCl₄/cisplatine/APAP en présence des limonoïdes de KgF25

L'effet des limonoïdes de KgF25 sur le taux de glutathion cellulaire, la génération des EOR et la formation du MDA a été évalué après intoxication des cellules. La déplétion du glutathion (figures 41A, 41B et 41C), la génération massive des EOR (figures 42A, 42B et 42C) et la surproduction du MDA (figures 43A, 43B et 43C) observées dans les hépatocytes L-02 incubées pendant 36 h en présence de l'APAP (10 mM), du CCl₄ (15 mM) et du cisplatine (20 µM) respectivement ont été inhibées significativement ($p < 0,05$) lorsque les cellules ont été co-traitées avec les limonoïdes (40 µM) de KgF25. Cet effet inhibiteur sur ces paramètres était comparable à celui observé dans les cellules co-traités avec le JNK inhibitor SP600125 (20 µM) et la silymarine (100 µg/mL).

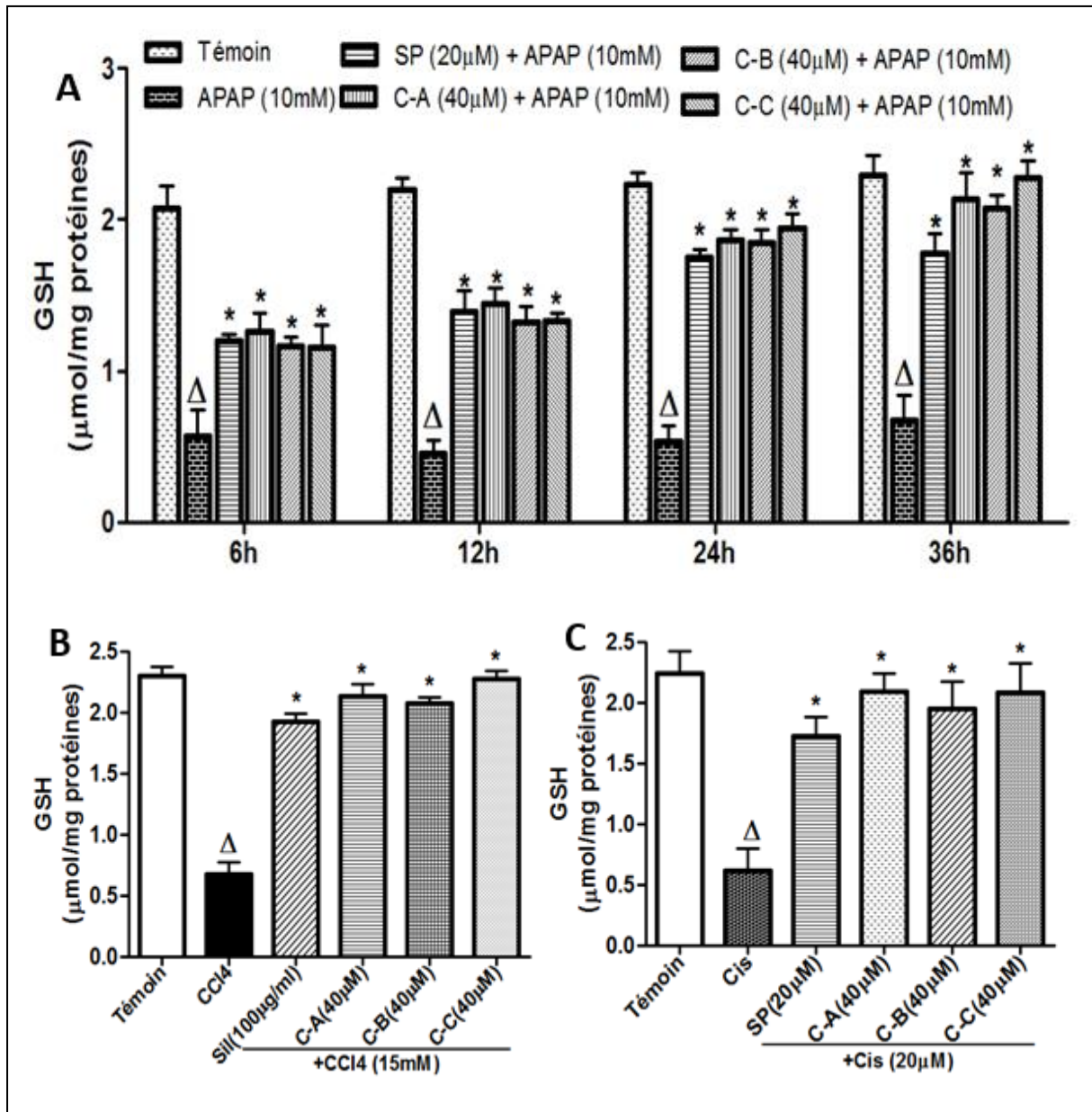


Figure 41: Taux du GSH dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP (A), au CCl₄ (B) et au cisplatine (C) en présence des limonoïdes de KgF25

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec l'APAP (10 mM)/CCl₄ (15mM)/cisplatine (20µM), ou co-traitées avec l'APAP/CCl₄/cisplatine et les limonoïdes isolés (40 µM), le JNK inhibitor SP600125 (20 µM) ou la silymarine (100 µg/mL) pendant 6; 12; 24 ou 36 h. Après chaque temps d'incubation, les protéines totales ont été extraites et les teneurs en GSH quantifiées. Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^ΔValeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe intoxiqué (APAP/CCl₄/cisplatine) par le test de Bonferroni. *Sil*: silymarine; *SP*: JNK inhibitor SP600125; *C-A*: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; *C-B*: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; *C-C*: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

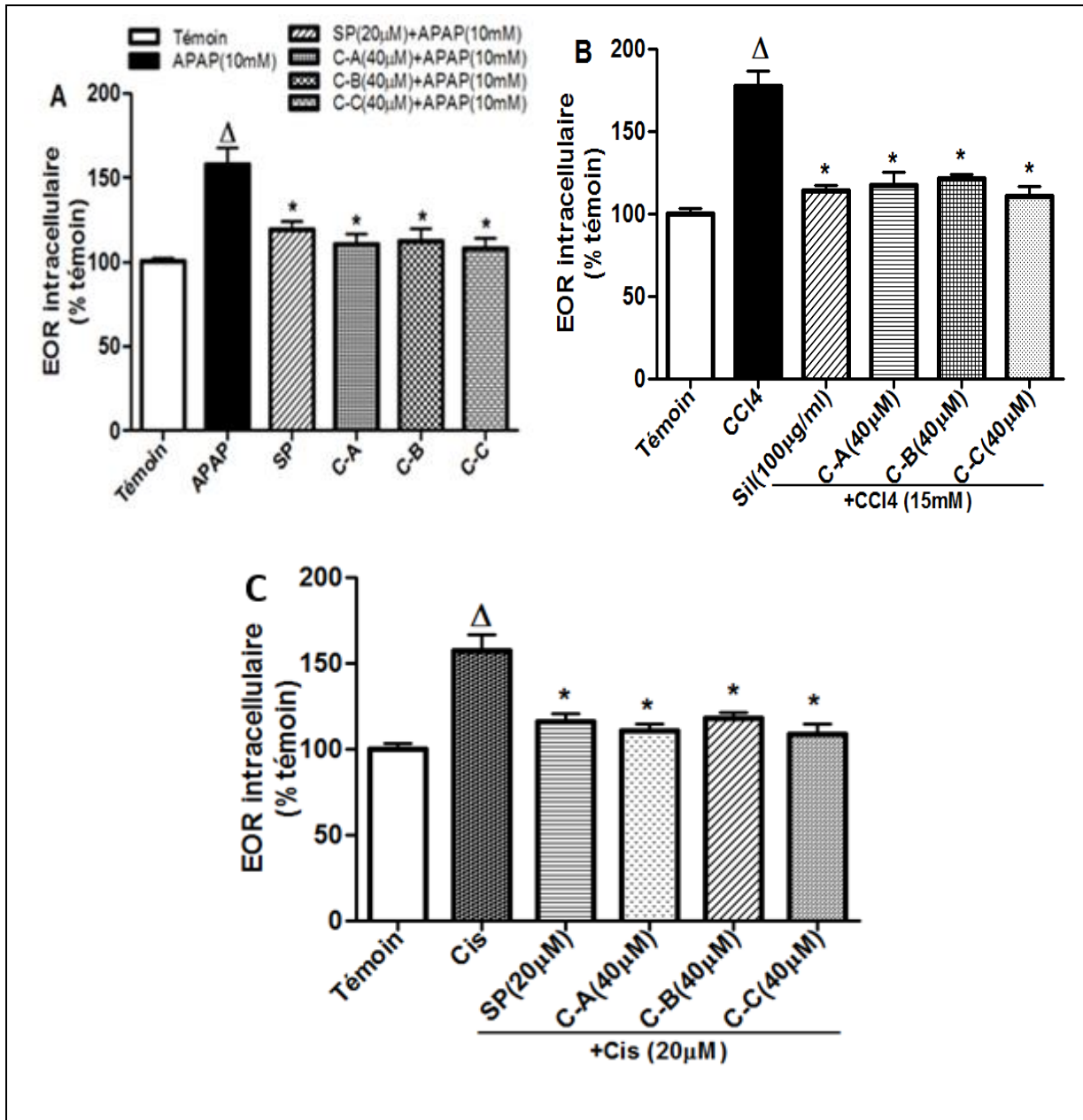


Figure 42: Teneur en EOR intracellulaire dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP (A), au CCl₄ (B) et au cisplatine (C) en présence des limonoïdes de KgF25

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec l'APAP (10 mM)/CCl₄ (15mM)/cisplatine (20µM), ou co-traitées avec l'APAP/CCl₄/cisplatine et les limonoïdes isolés (40 µM), le JNK inhibitor SP600125 (20 µM) ou la silymarine (100 µg/mL) pendant 36 h. Après traitement, le niveau d'EOR intracellulaire a été déterminé. Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^ΔValeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe intoxiqué (APAP/CCl₄/cisplatine) par le test de Bonferroni. **Sil**: silymarine; **SP**: JNK inhibitor SP600125; **C-A**: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; **C-B**: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; **C-C**: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

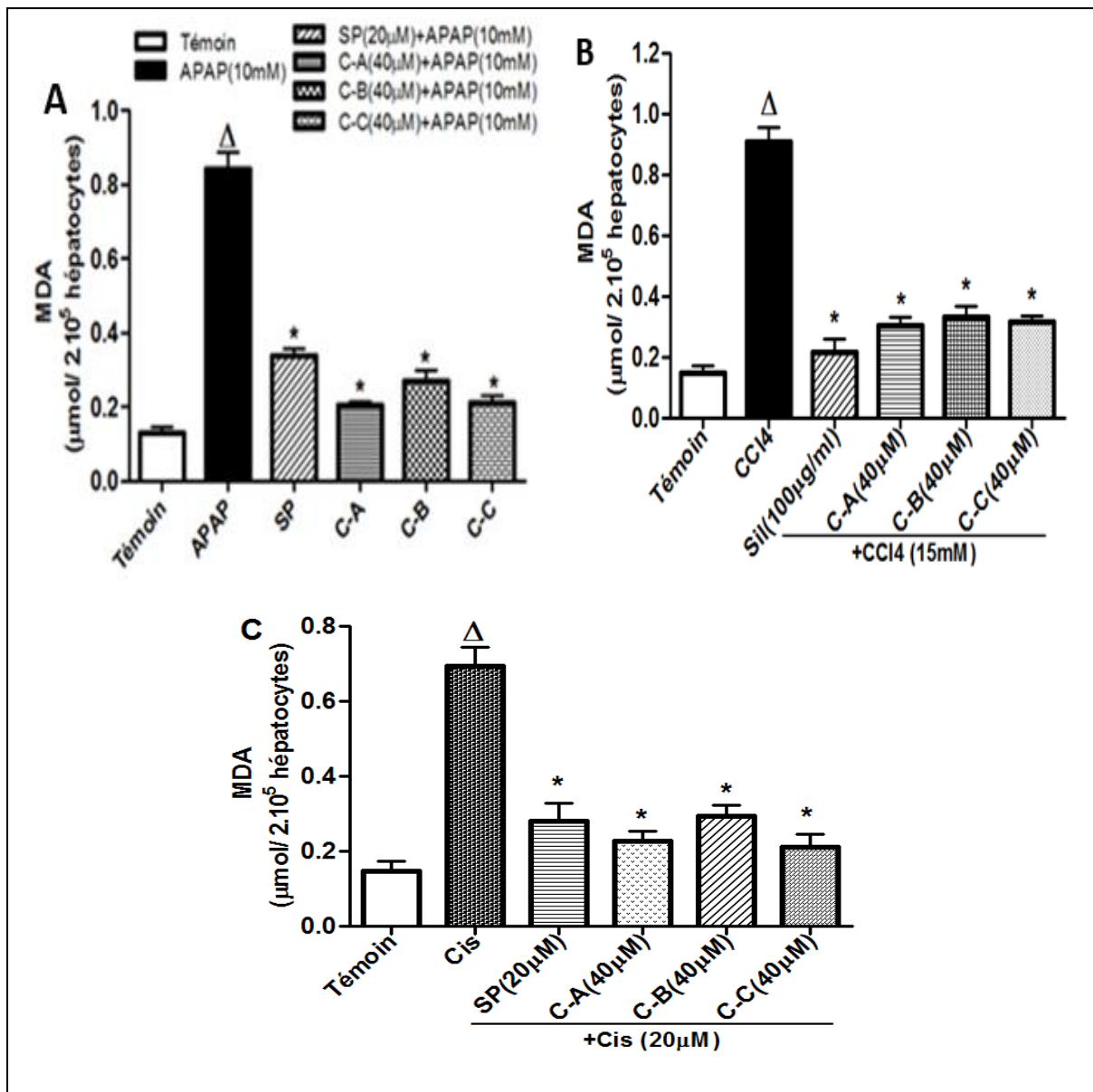


Figure 43: Production du MDA par les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP (A), au CCl₄ (B) et au cisplatine (C) en présence des limonoïdes de KgF25

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec l'APAP (10 mM)/CCl₄ (15mM)/cisplatine (20µM), ou co-traitées avec l'APAP/CCl₄/cisplatine et les limonoïdes isolés (40 µM), le JNK inhibitor SP600125 (20 µM) ou la silymarine (100 µg/mL) pendant 36 h. Après traitement, la concentration du MDA dans le milieu d'incubation a été déterminée. Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^ΔValeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe intoxiqué (APAP/CCl₄/cisplatine) par le test de Bonferroni. **Sil**: silymarine; **SP**: JNK inhibitor SP600125; **C-A**: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; **C-B**: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; **C-C**: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

III.1.2.3. Effet des sous fractions actives et des limonoïdes isolés de KgF25 sur l'activation du JNK et la translocation mitochondriale du phospho-JNK (p-JNK) dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP/cisplatine

Pour explorer les effets des limonoïdes sur la mort cellulaire dirigée par le JNK, les protéines totales ont été extraites premièrement 6 h après traitement des cellules L-02 avec 10 mM d'APAP ou 20 μ M de cisplatine et co-traitement avec l'APAP/cisplatine et les sous-fractions actives (100 μ g/mL) ou les limonoïdes isolés (40 μ M). L'expression du JNK2 et du p-JNK dans les lysats cellulaires ont été détectées par western blot. L'administration de l'APAP (figures 44A et 44C) ou du cisplatine (figures 44E et 44G) seul a provoqué une phosphorylation massive du JNK tandis que le co-traitement avec les sous-fractions actives ou les limonoïdes isolés a significativement ($p < 0,05$) inhibé l'activation du JNK.

Pour déterminer si les limonoïdes isolés inhibent la translocation du p-JNK dans la mitochondrie, les fractions de protéines cytosolique et mitochondriale ont été préparées et la phosphorylation du JNK a été évaluée. L'exposition des hépatocytes L-02 à 10 mM d'APAP (figures 45A et 45B) ou à 20 μ M de cisplatine (figures 45D et 45F) a causé l'activation du JNK dans le cytosol à 6 et 12 h après le traitement. Nous avons également observé dans la mitochondrie des cellules intoxiquées une modeste, mais significative ($p < 0,05$) augmentation du p-JNK 6 h après l'administration d'APAP (figure 47A) et massive du p-JNK après 12 h d'incubation (figure 45B et 45F). Le co-traitement des hépatocytes L-02 avec les limonoïdes de KgF25 ou le JNK inhibitor SP600125 a inhibé significativement ($p < 0,05$) la phosphorylation du JNK dans le cytosol 6 et 12 h après intoxication et sa translocation dans la mitochondrie (figures 45A, 45B, 45D et 45F).

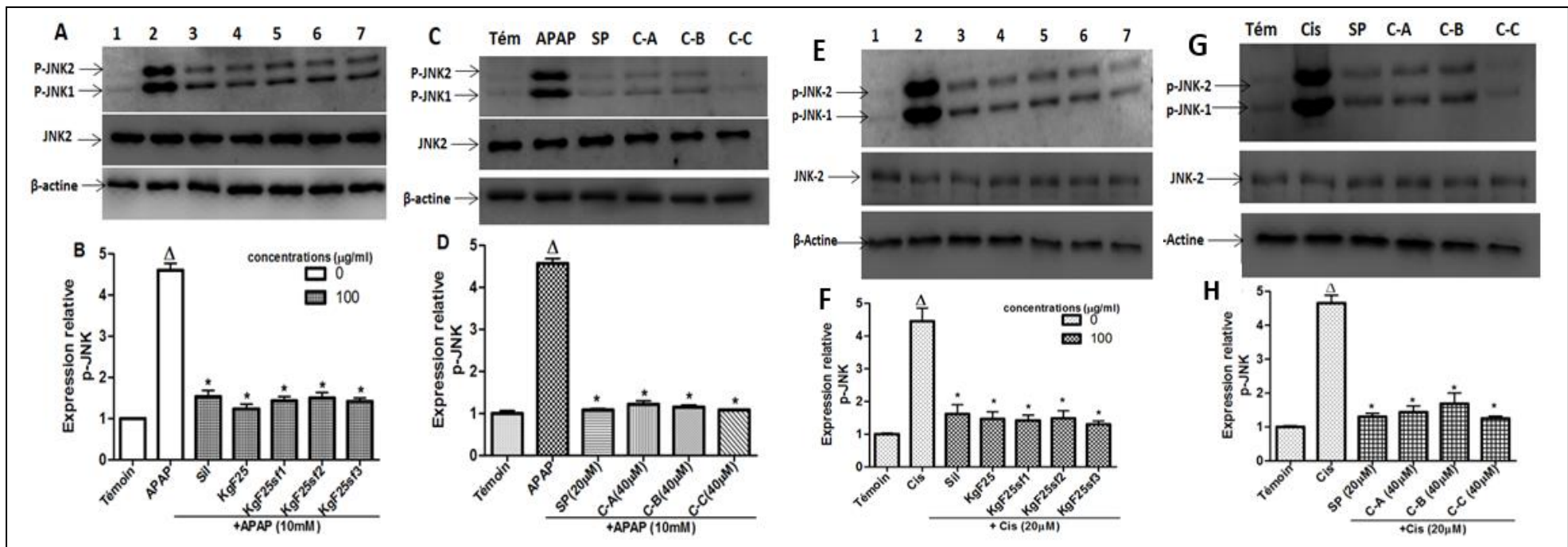


Figure 44: Phosphorylation du JNK dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP ou au cisplatine en présence des sous-fractions actives et des limonoïdes de KgF25

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec l'APAP (10 mM)/cisplatine (20 μM), ou co-traitées avec le APAP/ cisplatine et les sous fractions actives ou la silymarine (100 μg/mL) ou les limonoïdes isolés (40 μM) ou le JNK inhibitor SP600125 (20 μM) pendant 6 h. Après traitement, les protéines totales ont été extraites et l'expression du p-JNK a été déterminée par western blot. L'expression de la β-actine et du JNK-2 ont été utilisées comme contrôle interne. **A et C:** effet inhibiteur des sous-fractions actives et des composés isolés sur la phosphorylation du JNK dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP respectivement. **B et D:** analyse densitométrique des bandes protéiques respectivement pour les sous-fractions et les composés isolés. **E et G:** effet inhibiteur des sous-fractions actives et des composés isolés sur la phosphorylation du JNK dans les hépatocytes intoxiqués au cisplatine respectivement. **F et H:** analyse densitométrique des bandes protéiques respectivement pour les sous-fractions et les composés isolés. Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^ΔValeurs significativement différentes ($P < 0,05$) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes ($P < 0,05$) comparées au groupe intoxiqué (APAP/cisplatine) par le test de Bonferroni. Ligne1: Témoin; Ligne2: APAP/cisplatine; Ligne3: Sil+ APAP/cisplatine; Ligne4: KgF25+ APAP/cisplatine; Ligne5: KgF25sf1+ APAP/cisplatine; Ligne6: KgF25sf2+ APAP/cisplatine; Ligne7: KgF25sf3+ APAP/cisplatine. Tém: témoin; Cis: cisplatine; Sil: silymarine; KgF25: fractions au chlorure de méthylène/méthanol (75:25, v/v) de *K. grandifoliola*; KgF25sf1: sous-fraction 1 de KgF25; KgF25sf2: sous-fraction 2 de KgF25; KgF25sf3: sous-fraction 3 de KgF25. SP: JNK inhibitor SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygeduni.

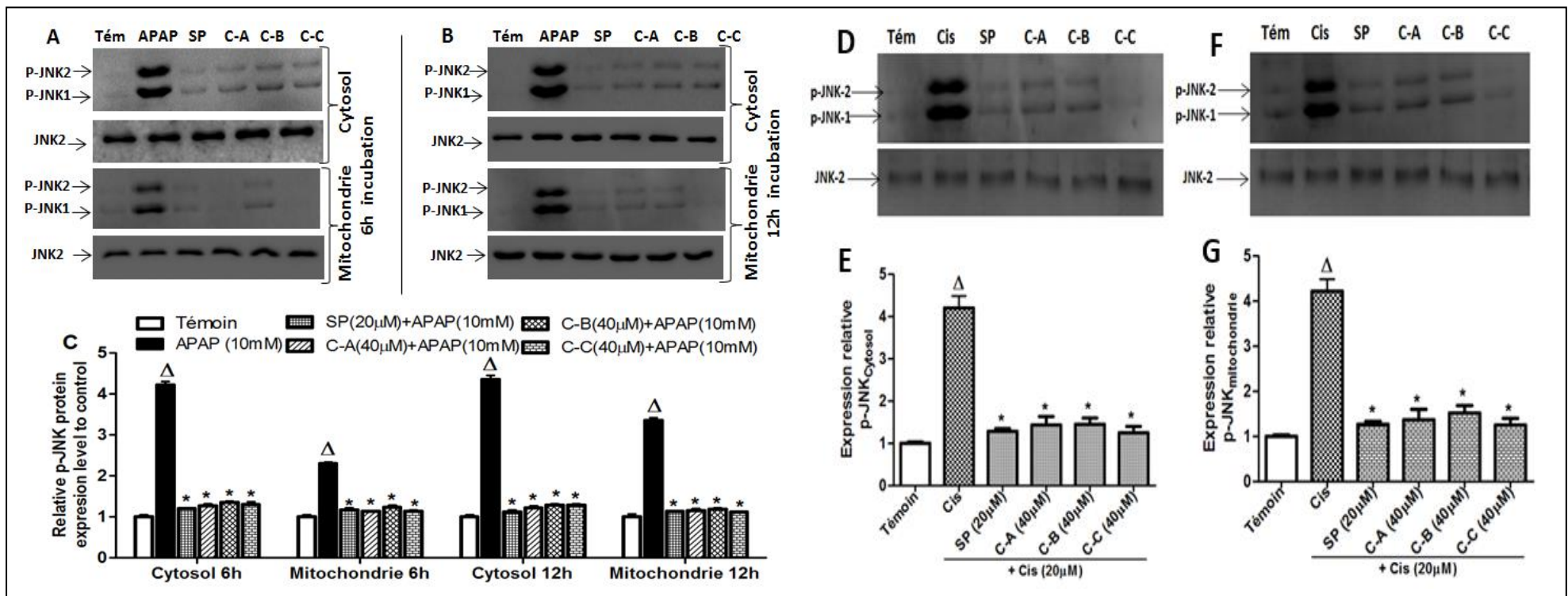


Figure 45: Phosphorylation cytosolique et translocation mitochondriale du phospho-JNK dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP et au cisplatine en présence des limonoïdes isolés de KgF25

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec l'APAP (10mM)/cisplatine (20 µM), ou co-traitées avec le APAP/ cisplatine et les limonoïdes isolés (40 µM) ou le JNK inhibiteur SP600125 (20 µM) pendant 6 h et 12 h. Après traitement, les protéines mitochondriales et cytoplasmiques ont été extraites. L'expression du p-JNK a été déterminée par western blot. L'expression de la β-actine et du JNK-2 ont été utilisées comme contrôle interne. **A** et **B**: effet inhibiteur des limonoïdes sur la phosphorylation du JNK dans le cytosol et la translocation mitochondriale du p-JNK dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP respectivement après 6 et 12h d'incubation. **C**: analyse densitométrique des bandes protéiques. **D** et **F**: effet inhibiteur des limonoïdes sur la phosphorylation du JNK dans le cytosol et la translocation mitochondriale du p-JNK dans les hépatocytes intoxiqués au cisplatine respectivement. **E** et **G**: analyse densitométrique des bandes protéiques. Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^ΔValeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe intoxiqué (APAP/cisplatine) par le test de Bonferroni. Tém: témoin; Cis: cisplatine; Sil: silymarine; SP: JNK inhibiteur SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygeduni.

III.1.2.4. Effet des limonoïdes de KgF25 sur la translocation mitochondriale du Bax et la sortie de l'AIF de la mitochondrie vers le cytosol dans les hépatocytes intoxiqués par l'APAP

La figure 46 ci-dessous présente l'effet des limonoïdes isolés de KgF25 sur la translocation mitochondriale de la protéine Bax et la libération de l'AIF de la mitochondrie vers le cytosol dans les hépatocytes L-02 intoxiqués par l'APAP.

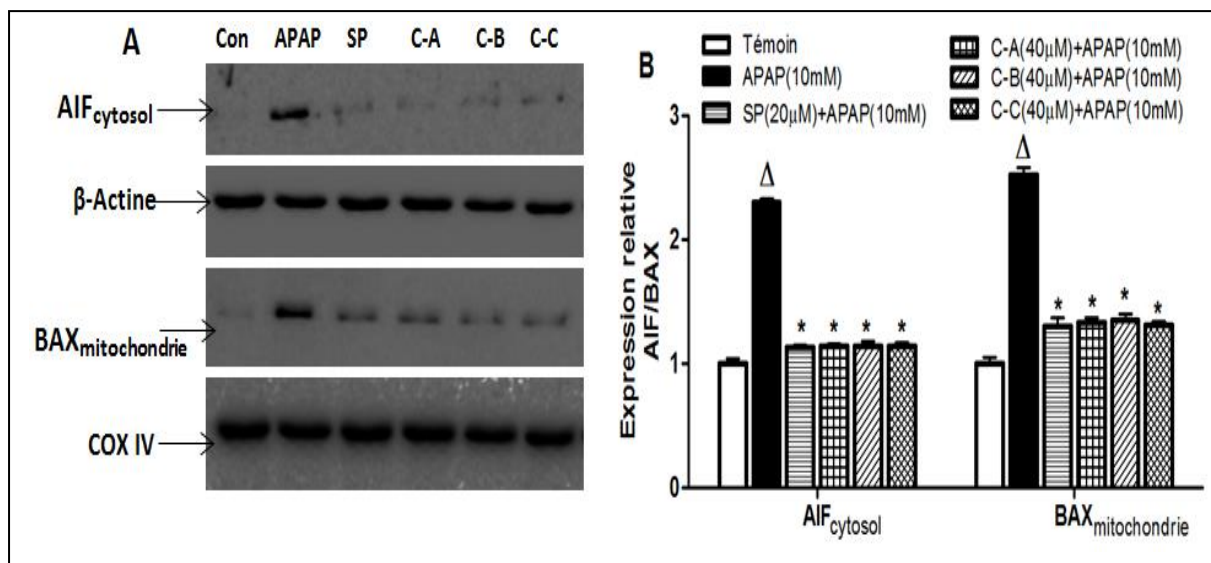


Figure 46: Translocation mitochondriale du Bax et la sortie de l'AIF vers le cytosol dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP en présence des limonoïdes de KgF25

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec l'APAP (15 mM)/cisplatine (10 mM), ou co-traitées avec le APAP/ cisplatine et les limonoïdes isolés (40 μM) ou le JNK inhibitor SP600125 (20 μM) pendant 6 h et 12 h. Après traitement, les protéines mitochondriales et cytoplasmiques ont été extraites. Les niveaux d'expression de l'AIF dans le cytosol et du Bax dans la mitochondrie (A) ont été déterminés par western blot. L'expression de la β-actine et du COX IV (cytochrome oxidase IV) ont été utilisées comme contrôle interne respectivement pour la fraction cytoplasmique et mitochondriale. B: analyse densitométrique des bandes protéiques respectivement dans le cytosol et la mitochondrie. Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types de trois expériences indépendantes réalisées en triple. *Valeurs significativement différentes ($P < 0,05$) comparées au groupe intoxiqué (APAP) par le test de de Bonferroni. Tém: témoin; SP: JNK inhibitor SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

Cette figure montre que la sortie l'AIF dans le cytosol et la translocation mitochondriale du Bax ont été observées par *western blot* dans les cellules intoxiquées avec l'APAP pendant 12 h (figure 48). Le co-traitement des cellules avec les limonoïdes isolés (40

μM) ou le *JNK inhibitor* (20 μM) a significativement ($p < 0,05$) inhibé la translocation mitochondriale du Bax et la sortie de l'AIF dans le cytosol.

III.1.2.5. Expression du Mkp-1 dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP ou au cisplatine en présence des sous-fractions actives et limonoïdes isolés

Le niveau d'expression du Mkp-1 a été évalué par western blot dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP ou au cisplatine en présence des sous-fractions actives et des limonoïdes isolés de KgF25.

Comme présenté sur la figure 47, l'exposition des hépatocytes L-02 à 10 mM d'APAP (figures 47A et 47B) ou à 20 μM de cisplatine (figures 47E et 47F) pendant 6 h a provoqué une diminution remarquable du niveau d'expression de la protéine Mkp-1. Le co-traitement des cellules avec la silymarine (100 μg/mL) (figures 47A et 47E) ou le *JNK inhibitor SP600125* (20 μM) (figures 47B et 47F) n'a eu aucun changement significatif sur l'expression du Mkp-1. Par contre, le niveau d'expression du Mkp-1 dans les cellules traitées avec les sous-fractions actives (100 μg/mL) (figures 49A et 49E) ou les limonoïdes de KgF25 (40 μM) (figures 47B et 47F) a été 2 fois supérieur à celui des cellules non traitées.

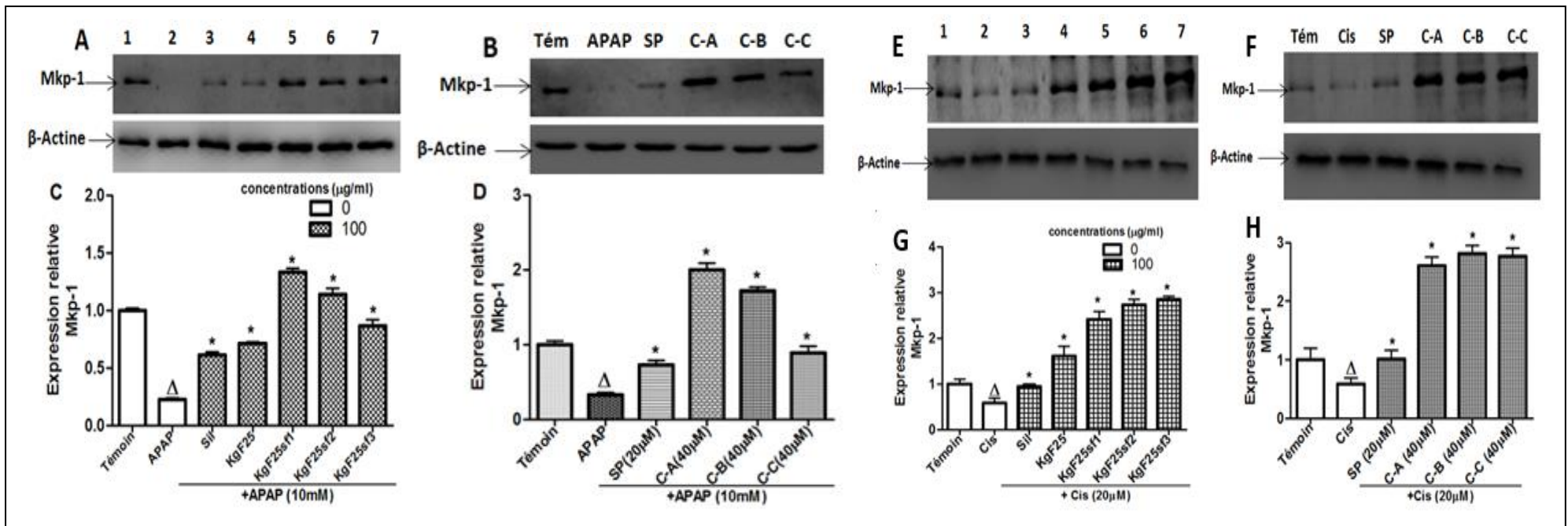


Figure 47: Expression du Mkp-1 dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP/Cisplatine en présence des sous-fractions actives et des limonoïdes isolés de KgF25

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec l'APAP (10mM)/cisplatine (20 μ M), ou co-traitées avec le APAP/cisplatine et les sous fractions actives ou la silymarine (100 μ g/mL) ou les limonoïdes isolés (40 μ M) ou le JNK inhibitor SP600125 (20 μ M) pendant 6 h. Après traitement, les protéines totales ont été extraites et l'expression du Mkp-1 a été déterminée par western blot. L'expression de la β -actine a été utilisée comme contrôle interne. **A** et **B**: effet inducteur des sous-fractions actives et des composés isolés sur l'expression du Mkp-1 dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP respectivement. **C** et **D**: analyse densitométrique des bandes protéiques respectivement pour les sous-fractions et les composés isolés. **E** et **F**: effet inducteur des sous-fractions actives et des composés isolés sur l'expression du Mkp-1 dans les hépatocytes intoxiqués au cisplatine respectivement. **G** et **H**: analyse densitométrique des bandes protéiques respectivement pour les sous-fractions et les composés isolés. Les valeurs sont les moyennes \pm écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^AValeurs significativement différentes ($P < 0,05$) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes ($P < 0,05$) comparées au groupe intoxiqué (APAP/cisplatine) par le test de Bonferroni. Ligne1: Témoin; Ligne2: APAP/cisplatine; Ligne3: Sil+ APAP/cisplatine; Ligne4: KgF25+ APAP/cisplatine; Ligne5: KgF25sf1+ APAP/cisplatine; Ligne6: KgF25sf2+ APAP/cisplatine; Ligne7: KgF25sf3+ APAP/cisplatine. Tém: témoin; Cis: cisplatine; Sil: silymarine; KgF25: fractions au chlorure de méthylène/méthanol (75:25, v/v) de *K. grandifoliola*; KgF25sf1: sous-fraction 1 de KgF25; KgF25sf2: sous-fraction 2 de KgF25; KgF25sf3: sous-fraction 3 de KgF25. SP: JNK inhibitor SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygeduni.

III.1.2.6. Translocation nucléaire du Nrf2 dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP/CCl₄/cisplatine en présence des limonoïdes de KgF25

La capacité des limonoïdes de KgF25 à induire la translocation nucléaire du Nrf2 a été déterminée par *western blot* après intoxication des hépatocytes avec l'APAP (10 mM), le CCl₄ (15 mM) ou le cisplatine (20 µM). Comme présenté à la figure 48 ci-après, le niveau d'expression du Nrf2 dans le noyau des cellules traitées avec les limonoïdes de KgF25 (40 µM) ou la silymarine (100 µg/mL) était 2 et 3 fois supérieur respectivement après 12 et 24 h d'incubation, comparativement aux cellules non traitées (figures 48A, 48C et 48E). Il n'y a eu aucun changement évident du niveau d'expression du Nrf2 dans le noyau des cellules intoxiquées ou traitées avec le *JNK inhibitor*. Plus intéressant encore, 24 h après le traitement, la translocation nucléaire du Nrf2 a corroboré à une diminution significative ($p < 0,05$) du Keap-1 (l'inhibiteur de l'activation du Nrf2) dans le cytosol des cellules traitées avec les limonoïdes de KgF25.

III.1.2.7. Expression de l'ARNm des enzymes antioxydants dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP/CCl₄/cisplatine en présence des limonoïdes isolés de KgF25

L'effet des limonoïdes isolés de KgF25 a été évalué par qRT-PCR sur l'expression des enzymes antioxydants: Catalase (CAT), Superoxyde dismutase-1 (SOD1) et Glutathion-S-transférase (GST) choisis comme gènes cibles du Nrf2. En parallèle, l'expression de la *Methionine adenosyltransférase-1A* (MAT1A) a aussi été évaluée. Les figures 49A, 49B et 49C ci-après montrent respectivement que l'exposition des hépatocytes L-02 à 10 mM d'APAP, 15 mM de CCl₄ et 20 µM de cisplatine pendant 36 h a significativement réduit les niveaux d'ARNm de la CAT, SOD1, GST et MAT1A, comparativement aux cellules non intoxiquées.

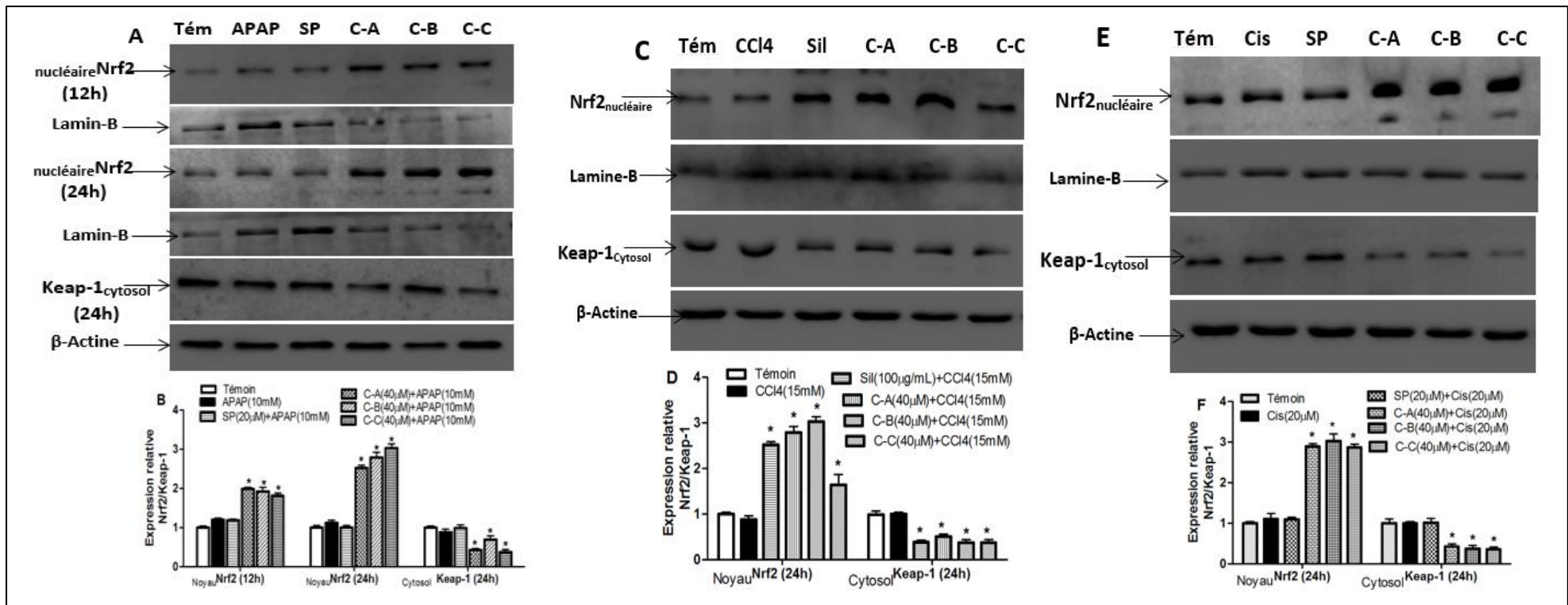


Figure 48: Effet des limonoïdes de Kgf25 sur la translocation nucléaire du Nrf2 dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP/CCl₄/cisplatine

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec l'APAP (10 mM)/CCl₄ (15 mM)/cisplatine (20 μM), ou co-traitées avec le APAP/CCl₄/cisplatine et les limonoïdes isolés (40 μM) ou le JNK inhibiteur SP600125 (20 μM) ou la silymarine (100 μg/mL) pendant 12 ou 24 h. Après traitement, les protéines nucléaires et cytoplasmiques ont été extraites. L'expression du Nrf2 dans le noyau et du Keap-1 dans le cytosol des cellules intoxiquées à l'APAP (A), au CCl₄ (C) et au cisplatine (E) ont été déterminées par western blot. L'expression de la β-actine et de Lamine-B ont été utilisées comme contrôle interne respectivement pour la fraction cytoplasmique et nucléaire. Analyses densitométriques des bandes protéiques pour l'APAP (B), le CCl₄ (D) et le cisplatine (F). Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ⁴Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe intoxiqué (APAP/CCl₄/cisplatine) par le test de Bonferroni. Tém: témoin; Cis: cisplatine; Sil: silymarine; SP: JNK inhibiteur SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygeduni.

Dans les cellules co-traitées avec les limonoïdes (40 µM) ou la silymarine (100 µg/mL), les niveaux d'expression de l'ARNm de la CAT, SOD1, GST et MAT1A, (étaient 2 à 3 fois supérieurs ceux des cellules non traitées (figures 51A, 51B et 51C).

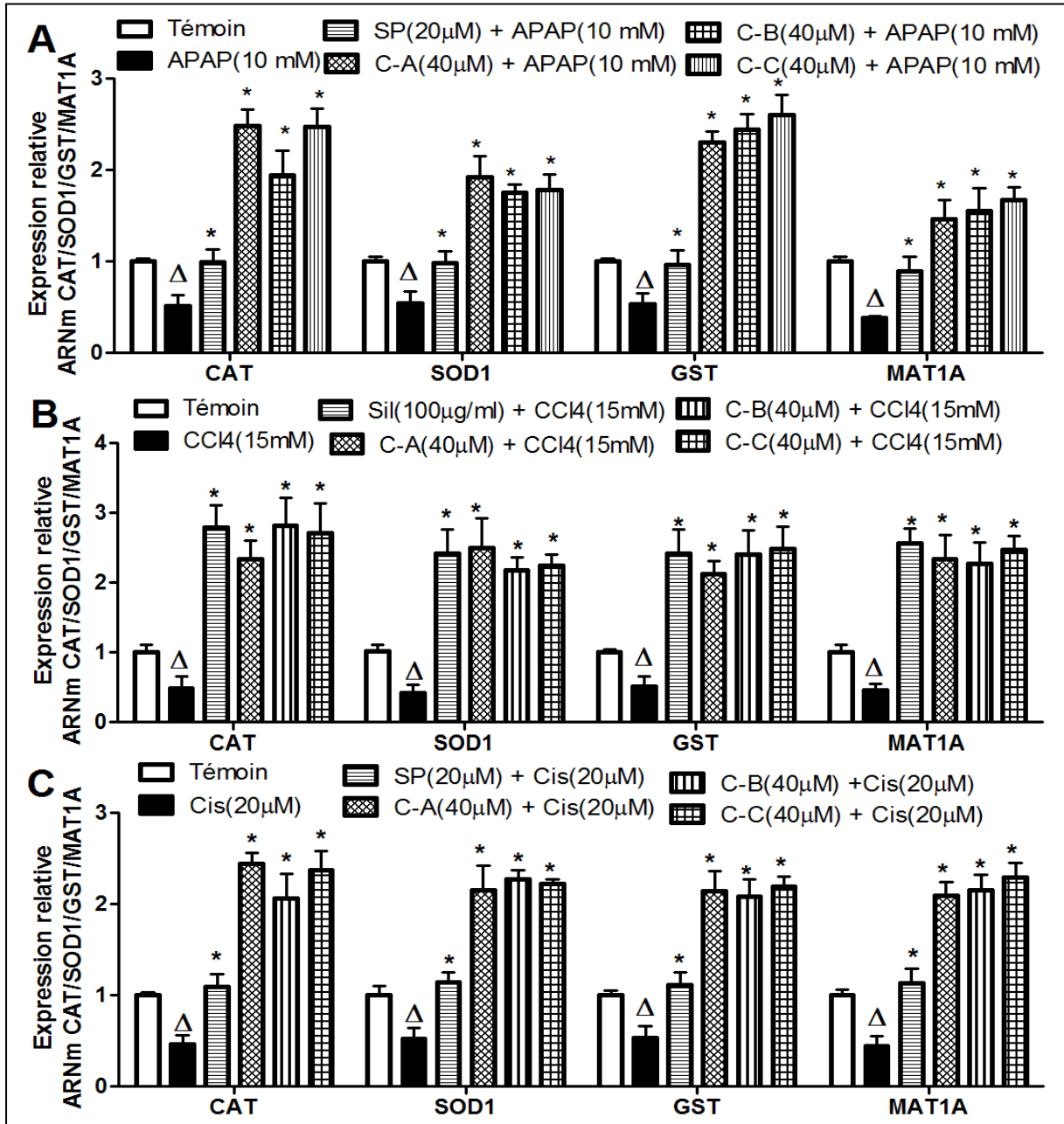


Figure 49: Effet des limonoïdes de KgF25 sur l'expression de l'ARNm des enzymes antioxydants CAT, SOD1, GST et MAT1A dans les hépatocytes L-02 intoxiqués à l'APAP/CCl4/cisplatine

Les cellules L-02 ont été traitées sans ou avec l'APAP (10 mM)/CCl4 (15 mM)/cisplatine (20 µM), ou co-traitées avec le APAP/CCl4/cisplatine et les limonoïdes isolés (40 µM) ou le JNK inhibiteur SP600125 (20 µM) ou la silymarine (100 µg/mL) pendant 36 h. Après traitement, les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression relative de l'ARNm de la CAT, de la SOD, du GST et

*de la MAT1A ont été déterminé par qRT-PCR dans les hépatocytes intoxiqués à l'APAP (A), au CCl₄ (B) et au cisplatine (C). L'expression du GAPDH a été utilisée comme contrôle interne. Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types de trois expériences indépendantes réalisées en triple. ^AValeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin; *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe intoxiqué (APAP/CCl₄/cisplatine) par le test de Bonferroni. Cis: cisplatine; Sil: silymarine; SP: JNK inhibitor SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygeduni.*

III.1.2.8. conclusion partielle 2

Au terme de cette deuxième partie de notre travail consacrée à l'étude des mécanismes moléculaires des propriétés anti-hépatotoxiques des composés actifs isolés de KgF25, nous pouvons dire que les limonoïdes isolés de la fraction active KgF25 protègent les hépatocytes L-02 contre la toxicité induite par le CCl₄, le ciplatine et l'APAP à travers:

- L'inhibition de l'activation métabolique des toxiques via la diminution de l'expression du CYP2E1;
- L'inhibition de la déplétion du pool de glutathion cellulaire, de la surproduction des espèces oxygénées réactives et de la peroxydation lipidique membranaires;
- L'inhibition de la phosphorylation du JNK et de la translocation mitochondriale du p-JNK;
- L'induction du Mkp-1, un inhibiteur endogène de la phosphorylation du JNK;
- L'induction de la translocation nucléaire du Nrf2 et de l'expression des enzymes antioxydants CAT, SOD1, GST et MAT1A.

III.1.3. Détermination de l'effet des composés isolés de KgF25 sur l'expression des gènes de quelques protéines impliquées dans les interactions VHC-cellule hôte au cours du cycle infectieux du VHC

Dans cette partie de notre étude, le but a été d'étudier les mécanismes moléculaires des limonoïdes actifs isolés de la fraction active KgF25 en déterminant leurs effets sur l'expression des gènes de quelques protéines impliquées dans les interactions VHC-cellule hôte au cours des étapes clés du cycle infectieux du VHC à savoir: l'entrée du virus dans la cellule hôte, la réplication virale et l'assemblage/libération des nouveaux virions.

III.1.3.1. Production des particules infectieuses HCVcc

La transfection des cellules Huh7.5 hautement permissive au VHCcc avec les transcrits d'ARN du Jc1/GLuc2A a permis la détection positive de l'activité de la luciférase GLuc2A dans le milieu d'incubation après 3 jours d'incubation, suivie d'une augmentation progressive de l'activité de la luciférase durant les 9 jours qui ont suivi (figure 50A). Dans le surnageant collecté 9 jours après la transfection, le titre viral infectieux TCID₅₀ a été de 10^{4,2} TCID₅₀/mL (figure 50B). L'infection des cellules Huh7.5 avec la préparation virale de 100 TCID₅₀ a permis la détection par immunofluorescence de la capsid du VHC dans presque toute les cellules après 72 h (figure 50C). Pour cette raison, la préparation virale 100 TCID₅₀ a été utilisée comme inoculum viral dans la suite de nos travaux pour les études des propriétés antivirales des limonoïdes de KgF25 sur le cycle infectieux du VHC.

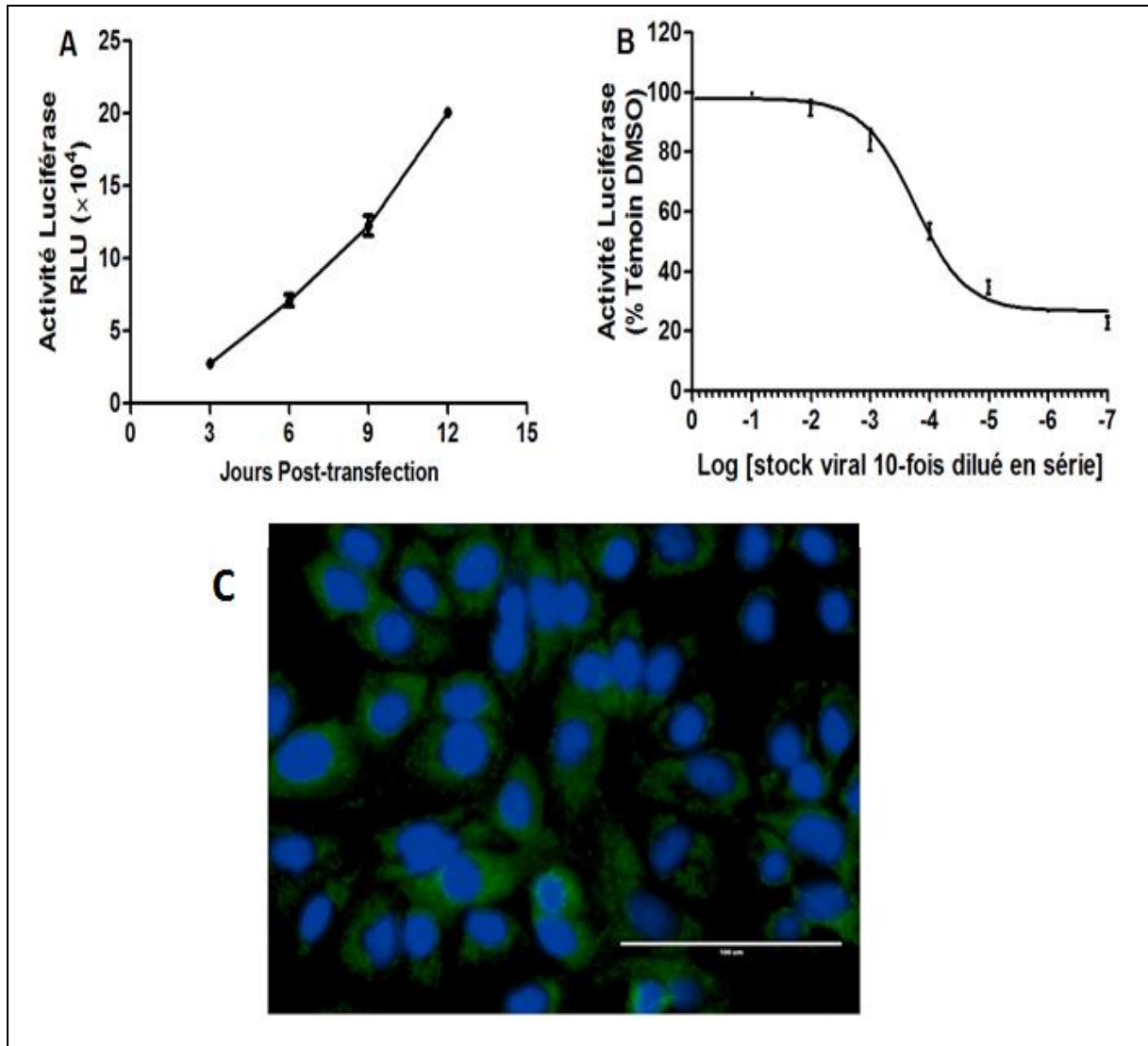


Figure 50: Transfection et infection des cellules Huh7.5 avec les transcrits d'ARN du virus chimérique Jc1/GLuc2A

(A): les cellules Huh7.5 ont été transfectées avec les transcrits d'ARN du Jc1/GLuc2A et les surnageants des cellules ont été collectés et remplacés tous les 3 jours après la transfection. Le milieu de culture collecté pour mesurer l'activité de la luciférase GLuc2A sécrétée. (B): le surnageant collecté 9 jours après la transfection contenant les particules HCVcc a été 10-fois dilué en série et utilisé pour infecter les cellules Huh7.5 naïves. L'activité de la luciférase GLuc2A sécrétée dans le milieu d'incubation a été mesurée après 72 h. (C): Les cellules Huh7.5 ont été infectées avec la préparation virale de 100 TCID₅₀ et soumises à l'immunofluorescence pour la détection de la protéine core du VHC après 72 h. L'image enregistrée avec le microscope à fluorescence présente la superposition de la protéine VHC core (en vert) et du noyau (en bleu).

III.1.3.2. Effet des limonoïdes de KgF25 sur la viabilité des cellules Huh7.5 et sur les étapes clés du cycle infectieux du VHC

Avant l'évaluation des propriétés antivirales des limonoïdes isolés, une étude dose-réponse dans le but de déterminer la concentration maximale qui ne serait pas toxique pour les cellules a été réalisée en testant leur effet sur la viabilité des cellules Huh7.5 aux concentrations finales respectives de 0,1; 1; 10; 50; 100; 500 et 1000 μM . Les résultats du test de viabilité cellulaire au MTT a montré que ces limonoïdes présentent à peu près les mêmes valeurs de concentration létale 50 (CL_{50}) (tableau 9); et jusqu'à 100 μM , la viabilité des cellules traitées avec les limonoïdes n'était pas significativement différente de celle des cellules témoins traitées avec le DMSO, après 72 h d'incubation (figure 51A). Par conséquent, la concentration de 100 μM a été considérée comme concentration maximale non-toxique.

Les particules HCVcc produites par le système Jc1/GLuc2A ont été utilisées pour évaluer l'effet des limonoïdes de KgF25 sur les différentes étapes du cycle infectieux du VHC. Pour chaque étape, les cellules Huh7.5 ont été infectées avec la préparation virale de 100 TCID_{50} et traitées avec les limonoïdes isolés à différentes concentrations jusqu'à 100 μM . Comparativement aux cellules traitées avec le DMSO, les limonoïdes ont inhibé de manière concentration-dépendante les étapes clés du cycle infectieux du VHC, à savoir l'entrée (figure 51B), la réplication (figure 51C) et l'assemblage/libération (figure 51D). Les concentrations efficaces 50 (CE_{50}) ont été déterminées pour chaque étape (tableau 9). Les index thérapeutiques ($\text{IT} = \text{CL}_{50}/\text{CE}_{50}$) pour le composé A (17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate), le composé B (7-deacetoxy-7-oxogedunin) et le composé C (7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin) ont été respectivement de 21,09; 17,89 et 21,17 pour l'étape d'entrée; 31, 01; 36,45 et 31,13 dans l'étape de réplication; 24,12 ; 26,36 et 19,63 pour l'étape d'assemblage/libération

(tableau 9). A la concentration 50 μM , le pourcentage d'inhibition dans chaque étape a été supérieur à 60% et cette concentration a été retenue pour la suite de nos travaux.

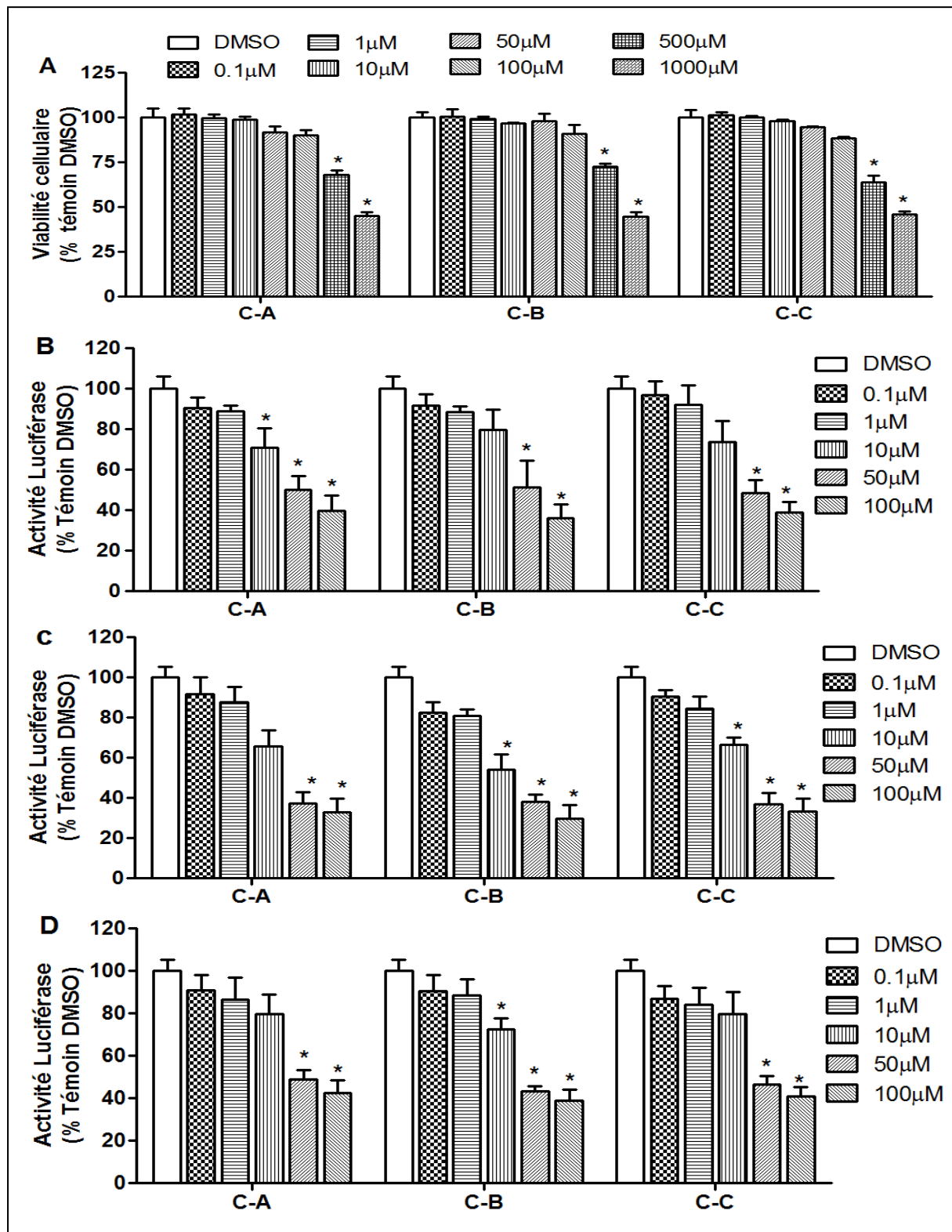


Figure 51: Effet des limonoïdes sur la viabilité cellulaire et inhibition des étapes clés du cycle infectieux du VHC par les limonoïdes de KgF25

Les cellules Huh7.5 ont été traitées avec les concentrations indiquées de limonoïdes et la viabilité cellulaire (A) a été déterminée après 72 h. Les cellules ont été infectées avec la

préparation virale de 100 TCID₅₀ et traitées avec le DMSO 0,2% ou les limonoïdes isolés (0,1 ; 1 ; 10 ; 50 et 50 µM). L'activité de la luciférase GLuc2A sécrété dans le milieu d'incubation après 72 h a été mesurée pour les étapes d'entrée (B), de réplication (C) et d'assemblage/libération (D) du cycle infectieux du VHC. Les valeurs sont les moyennes ± écarts-types de trois expériences indépendantes réalisées en triple. *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin (DMSO) par le test de de Bonferroni. C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

Tableau 9: Index thérapeutique des limonoïdes de KgF25 sur les étapes d'entrée, de réplication et d'assemblage du cycle infectieux du VHC

	Entrée			Replication		Assemblage	
	CL ₅₀	CE ₅₀	IT	CE ₅₀	IT	CE ₅₀	IT
C-A	877,75 ± 13,11	41,60 ± 4,48	21,09	28,30 ± 2,96	31,01	36,39 ± 4,06	24,12
C-B	904,18 ± 21,33	50,54 ± 4,24	17,89	24,81 ± 2,66	36,45	34,30 ± 4,24	26,36
C-C	868,11 ± 15,75	41,03 ± 3,55	21,17	27,88 ± 1,97	31,13	44,22 ± 3,72	19,63

IT = CL₅₀/CE₅₀: index thérapeutique; CE₅₀: Concentration efficace 50; CL₅₀: Concentration létale 50; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

III.1.3.3. Inhibition de l'étape d'entrée par les limonoïdes de KgF25 via la diminution de l'expression du récepteur CD81

La figure 52 ci-après présente l'expression du récepteur membranaire CD81 évaluée par cytométrie de flux 48 h après le traitement des cellules avec 50 µM des limonoïdes. De cette figure, il ressort que dans les cellules traitées avec les limonoïdes de KgF25, le pourcentage de cellules exprimant le récepteur CD81 a diminué de 75% comparativement aux cellules traitées avec le DMSO (figure 52).

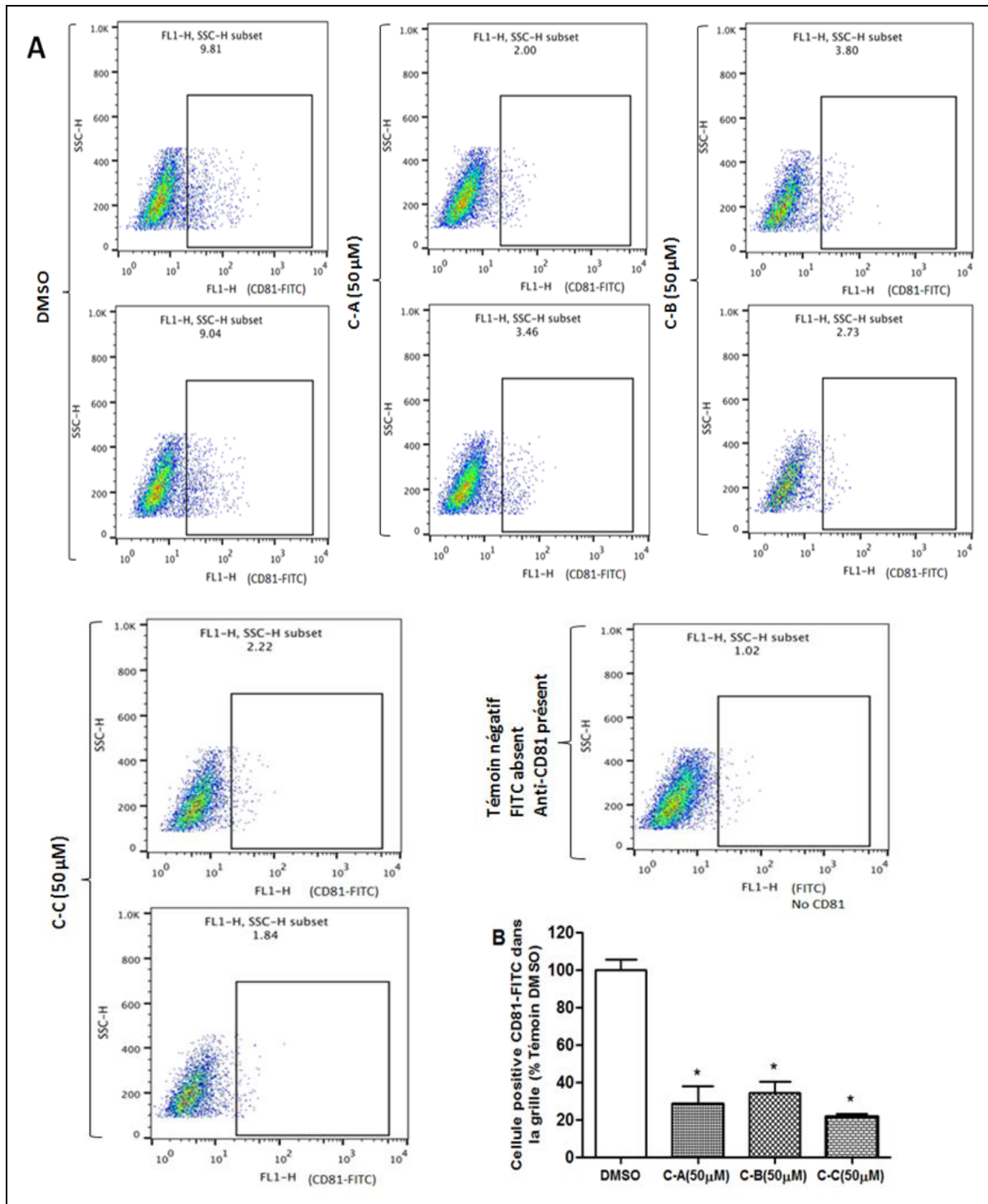


Figure 52: Analyse de l'effet des limonoïdes de KgF25 sur l'expression du récepteur CD81 par cytométrie de flux

Les cellules Hu7.5 ont été traitées avec le DMSO 0,2% ou les limonoïdes isolés pendant 48 h. Le niveau d'expression du récepteur CD81 (A) a été déterminé par l'analyse en cytométrie de flux. (B): Pourcentage des cellules positives CD81-FITC dans la grille. Les valeurs sont les moyennes \pm écarts-types de trois expériences indépendantes réalisées en triple. *Valeurs significativement différentes ($P < 0,05$) comparées au groupe témoin (DMSO) par le test de Bonferroni. C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

La figure 53 ci-dessous présente l'effet des limonoïdes isolés de KgF25 sur le blocage du récepteur CD81 effectué en utilisant l'anticorps anti-CD81 comme témoin positif. Le prétraitement des cellules Huh7.5 avec les limonoïdes (50 μ M) de KgF25 a significativement ($p < 0,05$) inhibé l'infection au VHC comme démontré par immunofluorescence pour la détection de la capside du VHC (figure 53A) et la mesure de l'activité de la luciférase GLuc2A sécrétée dans le milieu de culture (figure 53B). Ces effets étaient comparables à ceux observés sur les cellules prétraitées avec l'anticorps anti-CD81 (10 μ g/mL).

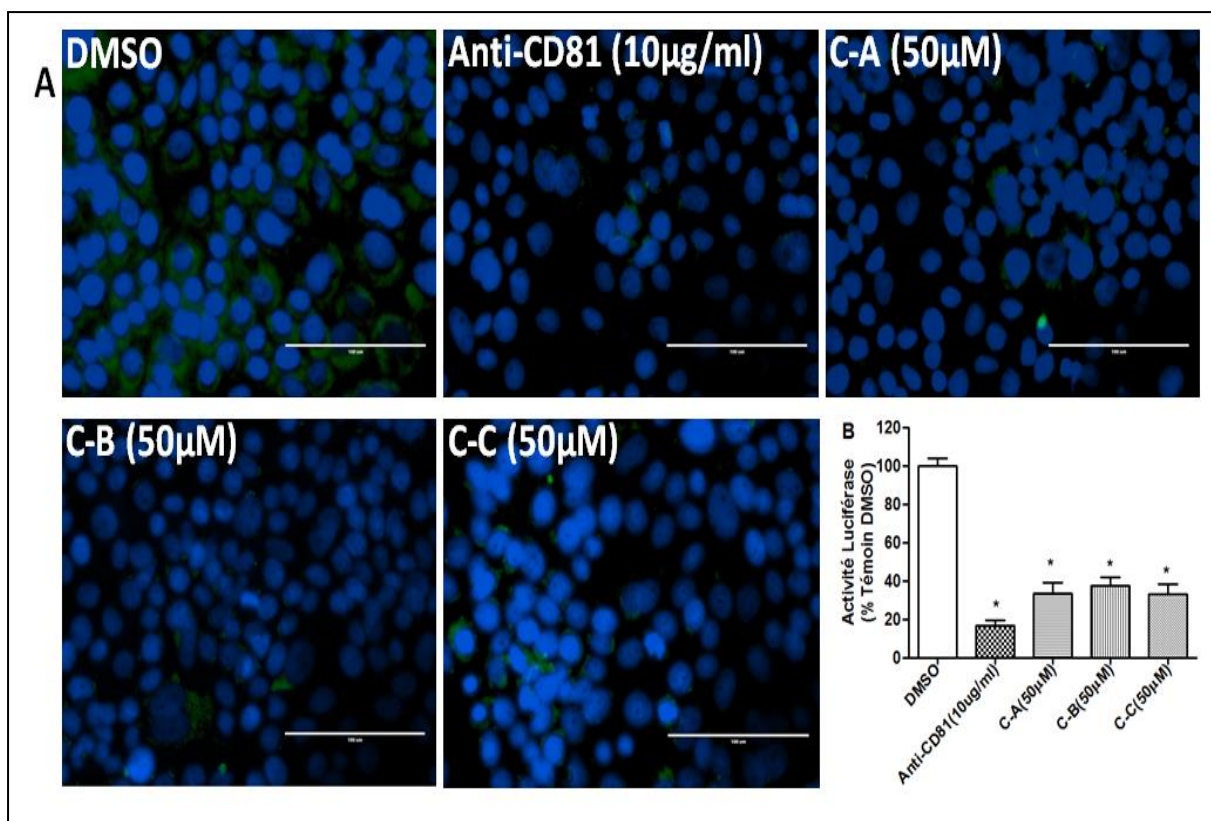


Figure 53: Immunofluorescence pour la détection de la capside du VHC montrant l'effet des limonoïdes isolés sur l'étape d'entrée du VHC

Les cellules Huh7.5 ont été pré-incubées avec le DMSO 0,2%, l'anticorps anti-CD81 (10 μ g/mL) ou les limonoïdes (50 μ M) pendant 1 h et infectées avec la préparation virale de 100 TCID₅₀ pendant 4 h. Puis les cellules ont été lavées et incubées avec le milieu frais. Après 72, les cellules ont été soumises à l'immunofluorescence pour la détection de la protéine core du VHC (A). L'image enregistrée avec le microscope à fluorescence présente la superposition de la protéine VHC core (en vert) et du noyau (en bleu). Activité de la luciférase GLuc2A sécrétée dans le milieu d'incubation (B). Les valeurs sont les moyennes \pm écart-types de trois expériences indépendantes réalisées en triple. *Valeurs significativement différentes ($P < 0,05$)

comparées au groupe témoin (DMSO) par le test de Bonferroni. **C-A:** 17-*epi*-methyl-6-hydroxyangolensate; **C-B:** 7-deacetoxy-7-oxogedunin; **C-C:** 7-deacetoxy-7*R*-hydroxygedunin.

III.1.3.4. Effet des limonoïdes de KgF25 sur le niveau d'expression de la NS5B, du PI4KA et de l'OAS-3 au cours de l'étape de réplication du VHC

Pour avoir une idée du mécanisme par lequel les limonoïdes isolés de KgF25 inhibent la réplication du VHC, l'effet de ces limonoïdes sur l'expression de la protéine virale NS5B, de l'enzyme hôte PI4KA (*Class-III Phosphatidylinositol 4-kinase- α*) et de la protéine antivirale OAS-3 (*2',5'-oligoadenylate synthase-3*) a été évalué. Parallèlement, l'effet du Danoprevir, un DAAs utilisé ici comme témoin positif a aussi été analysé. L'immunofluorescence pour la détection de la protéine core du VHC (figure 54A) et la mesure de l'activité de la luciférase GLuc2A dans le milieu d'incubation (figure 54B) montrent que l'effet inhibiteur des limonoïdes est comparable à celui du Danoprevir. L'analyse western blot a révélé que les limonoïdes diminuent l'expression de la protéine NS5B de manière similaire que le Danoprevir (figure 54C). Cependant, le Danoprevir n'a affecté ni l'expression du PI4KA, ni l'expression de l'OAS-3 (figure 54C) comparativement aux cellules témoins DMSO. Par contre, dans les cellules traitées avec les limonoïdes, l'expression du PI4KA a significativement ($p < 0,05$) diminué tandis que l'expression de l'OAS-3 était 2,7 fois supérieure à celui des cellules traitées avec le DMSO.

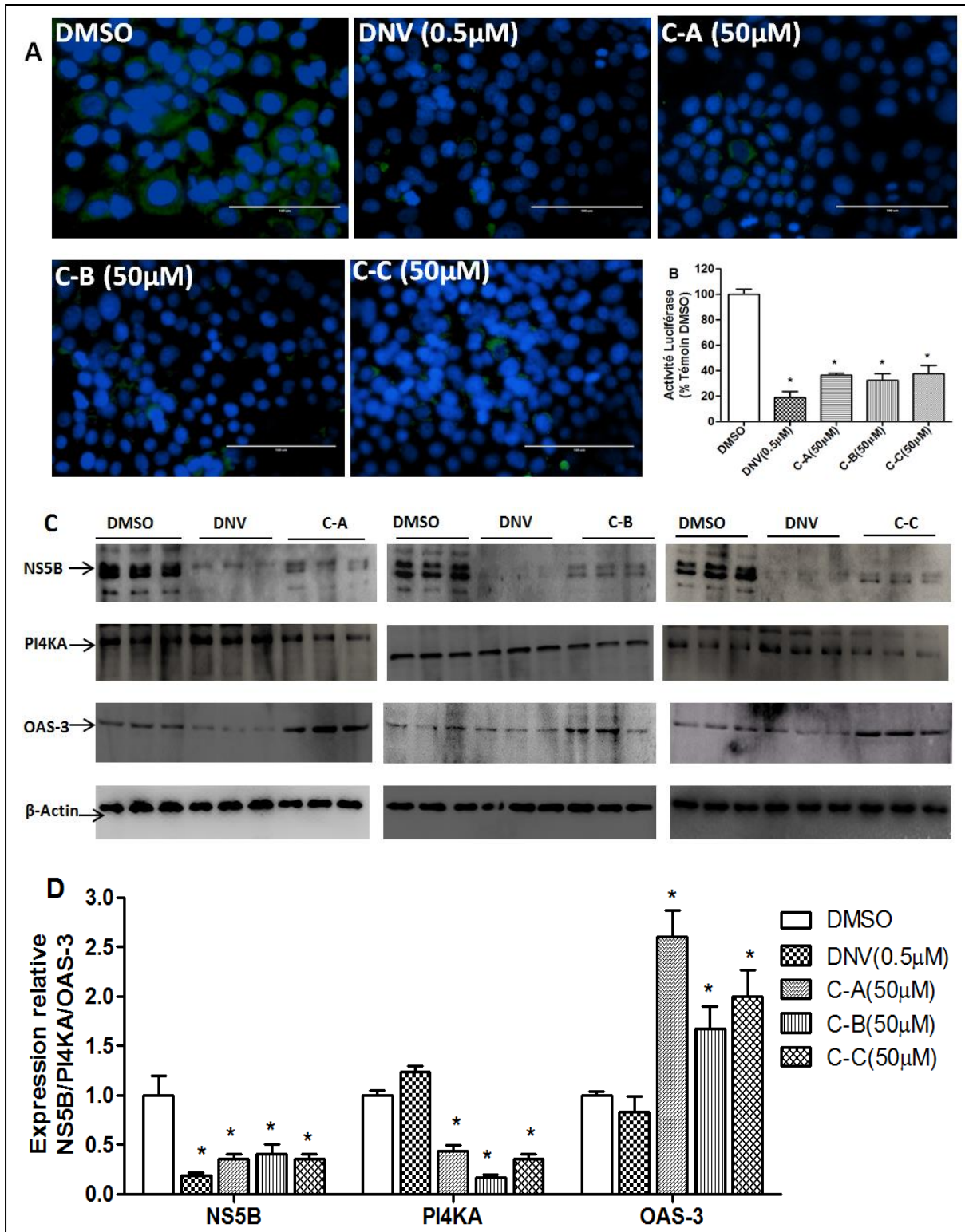


Figure 54: Mécanisme antiviral des limonoïdes de KgF25 sur l'étape de réplication

Les cellules ont été infectées avec la préparation virale de 100 TCID₅₀ pendant 4 h, puis lavées et incubées avec le milieu frais contenant le DMSO (0,2%), le DNV (0,5 μM) ou les limonoïdes (50 μM). Après 72 h, les cellules ont été soumises à l'immunofluorescence pour la détection de la protéine core du VHC (A). Les images enregistrées avec le microscope à fluorescence présentent la superposition de la protéine core du VHC (en vert) et du noyau (en bleu). Activité de la luciférase GLuc2A sécrétée dans le milieu d'incubation (B). Les cellules

ont été infectées avec la préparation virale de 100 TCID₅₀ pendant 4 h, puis lavées et incubées avec le milieu frais contenant le DMSO (0,2%), le DNV (0,5 µM) ou les limonoïdes (50 µM). Après 72 h, les protéines totales ont été extraites des cellules et l'expression de la NS5B, du PI4KA et de l'OAS-3 a été analysée par western blot (C). L'expression de la β-actine a été utilisée comme contrôle interne. (D): analyse densitométrique des bandes de protéines (n=3). Les valeurs sont les moyennes ± ET de trois expériences indépendantes réalisées en triple. *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin (DMSO) par le test de Bonferroni. C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin. DNV: Danoprevir.

III.1.3.5. Effet des limonoïdes de KgF25 sur l'expression du DGAT-1 dans l'étape d'assemblage/libération du cycle infectieux du VHC

L'expression du DGAT-1 (Diacylglycerol acyltransferase-1) a été analysée par western blot afin de déterminer si les limonoïdes de KgF25 inhibent l'étape d'assemblage/libération du cycle infectieux du VHC par la modulation de l'expression de cette enzyme. Comme présenté sur la figure 55, ni les limonoïdes de KgF25, ni le Danoprevir n'ont significativement affecté l'expression du DGAT-1, comparativement aux cellules traitées avec le DMSO à 0,2%.

III.1.3.6. Conclusion partielle 3

Au terme de cette partie de notre étude, les résultats obtenus montrent que les limonoïdes isolés de *K. grandifoliola* inhibent le cycle infectieux du VHC *in vitro* en ciblant principalement:

- L'étape d'entrée du virus via la diminution de l'expression du récepteur CD81,
- L'étape de réplication du virus à travers l'inhibition de l'expression de la NS5B et du PI4KA, et l'induction de l'OAS-3.

En outre, ces limonoïdes inhibent l'étape d'assemblage par un mécanisme autre que celui de l'inhibition de l'expression du DGAT-1.

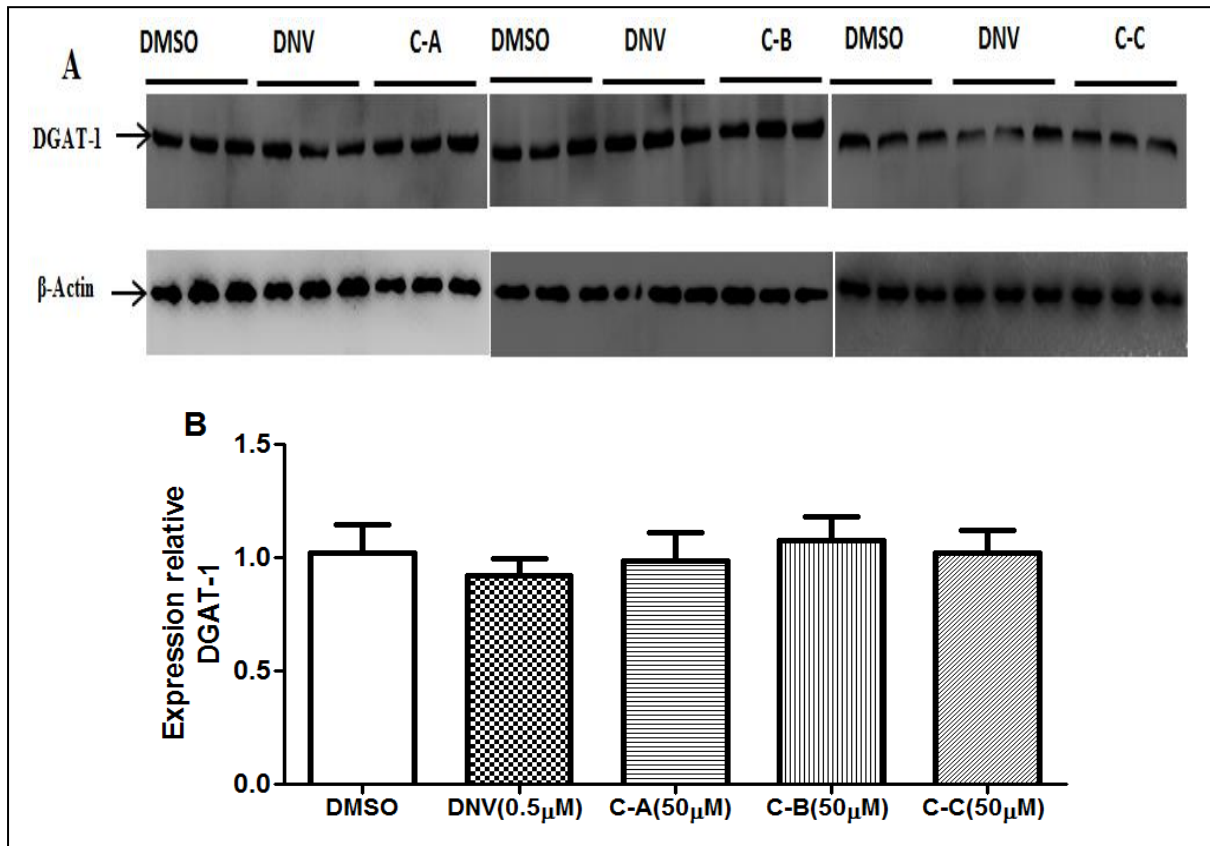


Figure 55: Effet des limonoïdes sur l'expression du DGAT-1 dans l'étape d'assemblage/libération

Les cellules Huh7.5 ont été infectées avec la préparation virale de 100 TCID₅₀ pendant 4 h, puis lavées et incubées avec le milieu frais contenant le DMSO (0,2%), le DNV (0,5 μM) ou les limonoïdes (50 μM). Après 72 h, les protéines totales ont été extraites des cellules et l'expression du DGAT-1 a été analysée par western blot (A). L'expression de la β-actine a été utilisée comme contrôle interne. (B): analyse densitométrique des bandes de protéines (n=3). Les valeurs sont les moyennes ± ET de trois expériences indépendantes réalisées en triple. *Valeurs significativement différentes (P<0,05) comparées au groupe témoin (DMSO) par le test de Bonferroni. C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin. DNV: Danoprevir.

III.2. Discussions

En dépit des progrès scientifiques considérables réalisés ces dernières années dans le domaine de l'hépatologie, les maladies du foie sont en constante augmentation dans le monde et comptent parmi les causes de mortalité les plus élevées (**Cainelli, 2012**). Les hépatites toxiques et virales sont les causes majeures des maladies du foie et partagent toutes une progression similaire caractérisée par le développement de la cirrhose et du cancer de foie (**Gao et al., 2012; Ivanov et al., 2013**). *K. grandifoliola*, une plante de la famille des meliaceae, a été étudiée pour ses propriétés anti-hépatotoxiques et contre le virus de l'hépatite C (VHC); et une fraction, nommée KgF25, avec une activité très promotrice a été isolée (**Njayou et al., 2015; Njayou et al., 2016; Galani et al., 2016**). Le but principal de la présente étude a été d'étudier les mécanismes moléculaires des propriétés anti-hépatotoxiques et anti-VHC des composés actifs de cette fraction. Les résultats obtenus montrent l'action protectrice de trois limonoïdes isolés et dénommés 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate, 7-deacetoxy-7-oxogedunin et deacetoxy-7R-hydroxygedunin qui a été mise en évidence d'une part par leur capacité à altérer les principaux événements impliqués dans le mécanisme de mort cellulaire au cours de l'hépatotoxicité et à activer le système de défense antioxydant cellulaire; et d'autre part, par leur aptitude à inhiber les étapes clés du cycle infectieux du VHC.

Les hépatites toxiques sont principalement dues aux polluants environnementaux et aux médicaments. Parmi les polluants de l'environnement, le CCl_4 est un puissant hépatotoxique qui continue d'être utilisé au laboratoire pour évaluer les propriétés anti-hépatotoxiques des composés phytochimiques en utilisant aussi bien les techniques *in vivo* que *in vitro* (**Lim et al., 2016; Xiao et al., 2012b**). Quant aux médicaments, on distingue entre autres le paracétamol (APAP), l'analgésique et l'antipyrétique le plus utilisé dans le monde

qui est bien toléré à la dose thérapeutique, mais peut induire une hépatotoxicité très sévère et parfois la mort en cas d'overdose (**James et al., 2003; Nourajh et al., 2006**); et le cisplatine, un anticancéreux largement utilisé en chimiothérapie et dont l'hépatotoxicité associée à son utilisation limite son efficacité (**Sohn et al., 2008; Palipoch et al., 2014**). Dans la partie de notre étude concernant l'étude des mécanismes moléculaires anti-hépatotoxiques des composés actifs isolés de KgF25, le CCl₄, le cisplatine et l'APAP ont été utilisés comme modèle toxiques pour induire l'hépatite dans les hépatocytes L-02. En effet, les hépatocytes L-02 sont des cellules qui dérivent d'un foie d'adulte humain en bonne santé et sont communément utilisés pour les études d'hépatotoxicité induite par divers types de xénobiotiques. Cette lignée cellulaire présente l'avantage de se multiplier facilement *in vitro* et de reproduire la quasi-totalité de la pathophysiologie de l'hépatotoxicité induite par divers agents toxiques chez l'homme (**Xiao et al., 2014; Pang et al., 2016**).

L'hépatotoxicité des xénobiotiques est initiée par leur biotransformation par les enzymes du cytochrome P450 pour former les métabolites réactifs responsables de leur toxicité (**Jaeschke et al., 2002; Recknagel et al., 1989**). Dans ce processus de biotransformation, le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), la forme inductible des enzymes du système P450, joue un rôle majeur à cause de sa capacité à métaboliser et à activer plusieurs substances toxicologiques parmi lesquelles l'éthanol, le CCl₄, l'APAP, etc... en produits plus toxiques (**Guengerich et al., 1991; Yang et al., 1990**). Les études précédentes ont montré que l'expression du CYP2E1 peut être régulée aussi bien par les facteurs endogènes que les substances étrangères. En particulier, les composés qui induisent l'expression du CYP2E1 peuvent potentialiser l'hépatotoxicité. C'est le cas du CCl₄ ou de l'APAP (**Lieber, 1997; Caro et Cederbaum, 2004**). Par contre, les composés qui inhibent l'expression du CYP2E1 protègent le foie contre la toxicité des xénobiotiques (**Cederbaum, 2010**). Ainsi, l'inhibition de l'expression du CYP2E1 permet de réduire l'activation métabolique du CCl₄ ou de l'APAP

et par conséquent prévenir les dommages cellulaires qui s'en suivent (**Jaeschke et al., 2002; Tunon et al., 2009; Khathirvel et al., 2010**). Dans notre étude, la diminution de la viabilité cellulaire observée dans les cellules incubées uniquement en présence de l'APAP ou du CCl₄ a été associée à une surexpression du CYP2E1. Dans les cellules traitées avec les sous-fractions actives ou les limonoïdes de KgF25 ou la silymarine, la viabilité cellulaire a été maintenue comme dans les cellules non traitées (figures 35 et 36; 39 et 40) et l'expression du CYP2E1 a été inhibée considérablement (figure 42). Ces observations indiquent que la suppression de l'expression du CYP2E1 contribuerait à l'inhibition de l'activation métabolique de l'APAP et du CCl₄, et par conséquent aboutirait à la protection des hépatocytes L-02. Ces résultats corroborent également avec ceux rapportés dans la littérature démontrant les effets protecteurs des extraits aqueux d'*Amomum Cardamomum* (Zingiberaceae) et *Chrysanthemum indicum* (Asteraceae) contre la toxicité induite par le CCl₄; et du thioacremone, un composé isolé de *Allium sativum* (Amaryllidaceae) contre la toxicité de l'APAP à travers l'inhibition de l'expression du CYP2E1 (**Kim et al., 2013; Jeong et al., 2013; Lim et al., 2016**). Compte tenu du fait que le CYP2E1 participe au métabolisme des petits composés organiques tels que le CCl₄, l'APAP, l'éthanol et les nitrosamines, ces résultats suggèrent que les limonoïdes de KgF25 peuvent être des potentiels candidats médicaments pour les dommages hépatiques causées par l'expression du CYP2E1.

Au cours de l'hépatotoxicité des xénobiotiques, l'accumulation des métabolites réactifs, dont les radicaux libres CCl₃^o et CCl₃OO^o et le NAPQI, issus de la biotransformation du CCl₄ et de l'APAP respectivement, entraînent la déplétion du GSH et l'inactivation des enzymes (**Hinson et al., 2010; Zhu and Fun, 2000; Brattin et al., 1985**). Le GSH et les enzymes antioxydants sont considérés comme ayant un pouvoir antiradicalaire/antioxydant qui contribue au maintien de l'intégrité cellulaire et constituent une première ligne de défense intracellulaire. Bien que la diminution de la teneur en GSH ne conduise pas directement à la

mort des hépatocytes, cette déplétion entraîne l'inactivation des enzymes antioxydants et conduit à une génération excessive d'EOR intracellulaire aboutissant au stress oxydant (Schnackenberg *et al.*, 2009; Jaeschke *et al.*, 2012). L'augmentation anormale du taux d'EOR initie le processus de peroxydation des lipides membranaires et cause la perte de l'intégrité de la membrane plasmique, la destruction des organites cellulaires et la mort des cellules (Jaeschke *et al.*, 2002; Brattin *et al.*, 1985). En exposant les hépatocytes à une dose toxique de xénobiotiques, ces événements sont mis en évidence par une diminution du taux de GSH et une surproduction d'EOR intracellulaire indiquant le stress oxydant, une augmentation du taux de MDA indiquant la peroxydation des lipides membranaires et une élévation de l'activité des transaminases dans le milieu extracellulaire comme signe de l'altération de l'intégrité membranaire avec pour conséquence finale la baisse de la viabilité cellulaire (Kaiiska *et al.*, 2000; Jaeschke *et al.*, 2002; Jaeschke *et al.*, 2003; Pratibha *et al.*, 2006). Dans cette étude, l'incubation des cellules uniquement en présence des toxiques (CCl₄, cisplatine, APAP) a entraîné une diminution significative ($p < 0,05$) de la viabilité cellulaire et une sortie importante de l'ALAT dans le milieu d'incubation, comparativement aux cellules non traitées (figures 33, 35 et 37). Ces observations sont sans doute la conséquence de l'activation métabolique de ces xénobiotiques par l'induction de l'expression du CYP2E1, la déplétion du GSH, la surproduction d'EOR et l'augmentation du taux de MDA. Cependant, dans les trois modèles d'hépatotoxicité, le co-traitement des cellules avec les limonoïdes isolés de KgF25 a effectivement maintenu la viabilité cellulaire et inhibé la sortie de l'ALAT dans le milieu d'incubation (figures 33 à 38). De même, l'inhibition de l'expression du CYP2E1 observée dans les hépatocytes L-02 co-traités avec les limonoïdes de KgF25 (figure 44) a été couplée à la restauration du GSH cellulaire (figure 41), l'atténuation de la génération d'EOR (figure 42), et l'inhibition de la peroxydation lipidique (figure 43). Ces résultats suggèrent que les limonoïdes de KgF25 pourraient protéger le foie contre les

dommages oxydatifs induits par divers agents toxiques parmi lesquels les médicaments et les polluants environnementaux.

Après le processus de biotransformation, l'activation de la voie de signalisation des JNK (c-Jun N-terminal protein Kinase) a été identifiée comme le second évènement majeur qui perpétue l'hépatotoxicité induite par divers agents toxiques, parmi lesquels les médicaments dont l'APAP et le cisplatine (**Gunawan *et al.*, 2006; Francescato *et al.*, 2007; Hanawa *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2010; Omar *et al.*, 2016**). Les protéines JNK sont les membres de la famille des MAP Kinases qui régulent de nombreux processus hépatocellulaire dont l'apoptose des hépatocytes et le développement de la stéatose hépatique (**Singh *et al.*, 2009**). En effet, au cours de l'hépatotoxicité, le stress oxydant précoce qui s'installe suite à la déplétion du GSH initie l'activation de nombreuses kinases. L'activité de ces kinases converge à la phosphorylation du JNK qui migre par la suite dans la mitochondrie et amplifie le stress oxydant (**Nakagawa *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2010**). Le stress oxydant mitochondrial conduit ensuite à l'ouverture des pores MPT (*Membrane Permeability transition pores*), la destruction du potentiel membranaire et l'arrêt de la synthèse d'ATP. De plus, l'ouverture des pores MPT entraîne la translocation mitochondriale de la protéine Bax, le gonflement mitochondrial et la rupture de la membrane externe mitochondriale et la libération des protéines inter-membranaires telles que le cytochrome C, l'endonucléase G et l'AIF qui migrent ensuite dans le noyau et induisent la fragmentation de l'ADN (**Bajt *et al.*, 2006 ; Bajt *et al.*, 2008**). Pris ensemble, cette séquence d'événements a été reconnue comme la principale cause de mort cellulaire au cours des hépatites médicamenteuses (**Francescato *et al.*, 2007; Bajt *et al.*, 2011; Jaeschke *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2014; Omar *et al.*, 2016**). Pour mettre en lumière cette cascade de signalisation dans notre étude, la phosphorylation du JNK (figure 44), la translocation mitochondriale du p-JNK (figure 45) et de la protéine Bax (figure 46), et la libération de l'AIF (figure 46) dans le cytoplasme ont été observées dans les hépatocytes L-

02 incubées uniquement en présence des toxiques (APAP et cisplatine). Tous ces paramètres ont été effectivement inhibés lorsque les hépatocytes ont été traités avec les limonoïdes isolés de KgF25 et leurs effets ont été comparables à ceux observés dans les cellules traitées avec le JNK inhibitor SP600125 (figures 44, 45 et 46). Ces données suggèrent que l'inhibition de l'activation du JNK contribue au mécanisme de protection des limonoïdes de KgF25. Ces résultats sont également en accord avec les études antérieures rapportant que l'inhibition pharmacologique de la phosphorylation du JNK ou la suppression de l'expression des gènes du JNK réduit les dommages hépatiques après une hépatite médicamenteuse (**Gunawan et al., 2006; Henderson et al., 2007; Xie et al., 2014; Omar et al., 2016**). Ces observations offrent des garanties pour les études ultérieures concernant le développement d'un médicament à partir des limonoïdes de *K. grandifoliola* pour lutter contre les dommages hépatiques causés par l'activation du JNK.

Etant donné que le JNK a été reconnu comme un médiateur clé au cours de la progression des hépatites toxiques, les recherches ont été menées afin d'examiner les inhibiteurs endogènes ou exogènes du JNK pour leur potentiel utilisation thérapeutique (**Hanawa et al., 2008; Saito et al., 2010**). C'est notamment le cas des protéines de la famille des Mkp (*Mitogen-activated protein kinase phosphatase*) qui sont des phosphatases primaires responsables de la déphosphorylation des MAP kinases (**Keyes, 2000**). En particulier, le Mkp-1 est l'isoforme de la famille des Mkp qui inactive principalement le stress induit par la phosphorylation du JNK dans la plupart des tissus (**Hammer et al., 2006**). Il a été démontré que le Mkp-1 protège les souris contre les hépatites toxiques (**Wancket et al., 2012**). Cependant, l'excès d'EOR généré durant les hépatites toxiques inhibe l'expression du Mkp-1 et prolonge l'activation du JNK qui perpétue les dommages hépatiques (**Kamata et al., 2005 ; Boutros et al., 2008; Wancket et al., 2012**). Dans notre étude, la diminution de l'expression du Mkp-1 associée à la surproduction d'EOR et à l'activation prolongée du JNK a été

observée dans les cellules incubées uniquement en présence du cisplatine ou de l'APAP (figure 47). Le co-traitement des cellules avec le *JNK inhibitor SP600125* a seulement inhibé cette diminution tout en inhibant l'activation du JNK. Par contre, le niveau d'expression du Mkp-1 a été 2 fois supérieur dans les cellules co-traitées avec les limonoïdes de KgF25, comparativement aux cellules non traitées (figure 47). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la phosphorylation du JNK observée dans les cellules traitées avec les limonoïdes serait due à l'induction de l'expression du Mkp-1 qui peut dès lors être considéré comme une cible thérapeutique où agiraient les limonoïdes de *K. grandifoliola* dans le traitement des hépatites toxiques.

Le facteur de transcription Nrf2 qui régule l'expression de nombreux enzymes antioxydants a été reconnu comme jouant un rôle important dans la protection du foie contre l'hépatotoxicité induite par divers substances chimiques (**Gum and Cho, 2013; Pang et al., 2016**). Dans les conditions physiologiques normales, le Nrf2 est localisé dans le cytosol où il forme un complexe inactif avec son répresseur, le Keap-1 (**Jaiswal, 2004**). Suite à une stimulation appropriée, le Nrf2 se dissocie du Keap-1, migre dans le noyau où il se lie sur le promoteur des *Antioxidant Response Element* (ARE) et induit l'expression des enzymes antioxydants (**Niture et al., 2010**). Par conséquent, l'activation du système antioxydant Nrf2-Keap-1 peut être considérée comme une nouvelle stratégie pour prévenir ou réduire le stress oxydatif et ses conséquences et ainsi protéger le foie contre les toxiques. Dans cette étude, la capacité des limonoïdes isolés de KgF25 à protéger les hépatocytes L-02 contre la toxicité induite par le CCl₄, le cisplatine et l'APAP à travers l'induction de la translocation nucléaire du Nrf2 a été mise en évidence. Cet effet a été associé à la diminution de l'expression du Keap-1 dans le cytosol (figure 48). Ces résultats corroborent ceux de **Njayou et al. (2015)** qui ont démontré que la fraction active KgF25 de *K. grandifoliola* protège les cellules HC-04 contre la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène à travers l'induction de la translocation

nucléaire du Nrf2. Les gènes cibles du Nrf2 incluent les enzymes antioxydants et de détoxification comme la CAT, la SOD et le GST (**Jaiswal, 2004**). Le GST utilise le GSH pour éliminer les xénobiotiques ou leurs métabolites réactifs dans le foie. La SOD convertie l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂); puis la CAT métabolise le H₂O₂ pour former l'eau et l'oxygène (**Kaiiska et al., 2000; Dai et al., 2006**). L'expression de ces enzymes diminue au cours des hépatites toxiques (**Chen et al., 2013**). Dans notre étude, la diminution de l'expression de l'ARNm de la CAT, SOD1 et GST a été observée dans les hépatocytes incubés uniquement en présence des toxiques. Cependant, le niveau d'expression de l'ARNm de ces enzymes a augmenté considérablement dans les cellules traitées avec les limonoïdes isolés de KgF25 (figure 49). Pris ensemble, ces observations suggèrent que les limonoïdes de *K. grandifoliola* stimulent la dissociation du Nrf2 de son répresseur (Keap-1) et, celui-ci migre dans le noyau où il induit l'expression des enzymes CAT, GST et SOD. L'activation du système antioxydant Nrf2-keap-1 serait donc un mécanisme par lequel les limonoïdes de *K. grandifoliola* protègent le foie contre l'hépatotoxicité induite par les substances toxiques.

La *methionine adenosyltransferase-1A* (MAT1A) est l'enzyme clé responsable de la synthèse de la S-adénosyl-L-méthionine (SAM), le principal précurseur du GSH dans le foie (**Lieber et al., 2002**). Les études antérieures ont rapportées que la déplétion du pool de GSH hépatique induite par diverse substances toxiques est largement causée par la diminution de l'expression de MAT1A (**Cederbaum, 2010; Brown et al., 2010**). Dans notre étude, la déplétion du GSH observée dans les cellules incubées uniquement en présence des toxiques a été couplée avec la diminution de l'expression de l'ARNm de MAT1A. Le co-traitement des hépatocytes L-02 avec les limonoïdes a induit l'expression de MAT1A (figure 49). Ces données indiquent que la restauration du GSH observée dans les cellules traitées avec les limonoïdes de KgF25 serait liée à l'augmentation de l'expression de MAT1A et suggèrent que

les limonoïdes de *K. grandifoliola* pourraient protéger le foie contre les dommages oxydatifs induits par les agents hépatotoxiques en restaurant le pool de GSH via l'induction de l'expression de MAT1A.

Au regard des multiples effets des limonoïdes de *K. grandifoliola* sur l'expression des facteurs moléculaires contrôlant les hépatites toxiques, nous pouvons proposer un modèle décrivant leurs mécanismes d'action (figure 56) en prenant le cas particulier du paracétamol.

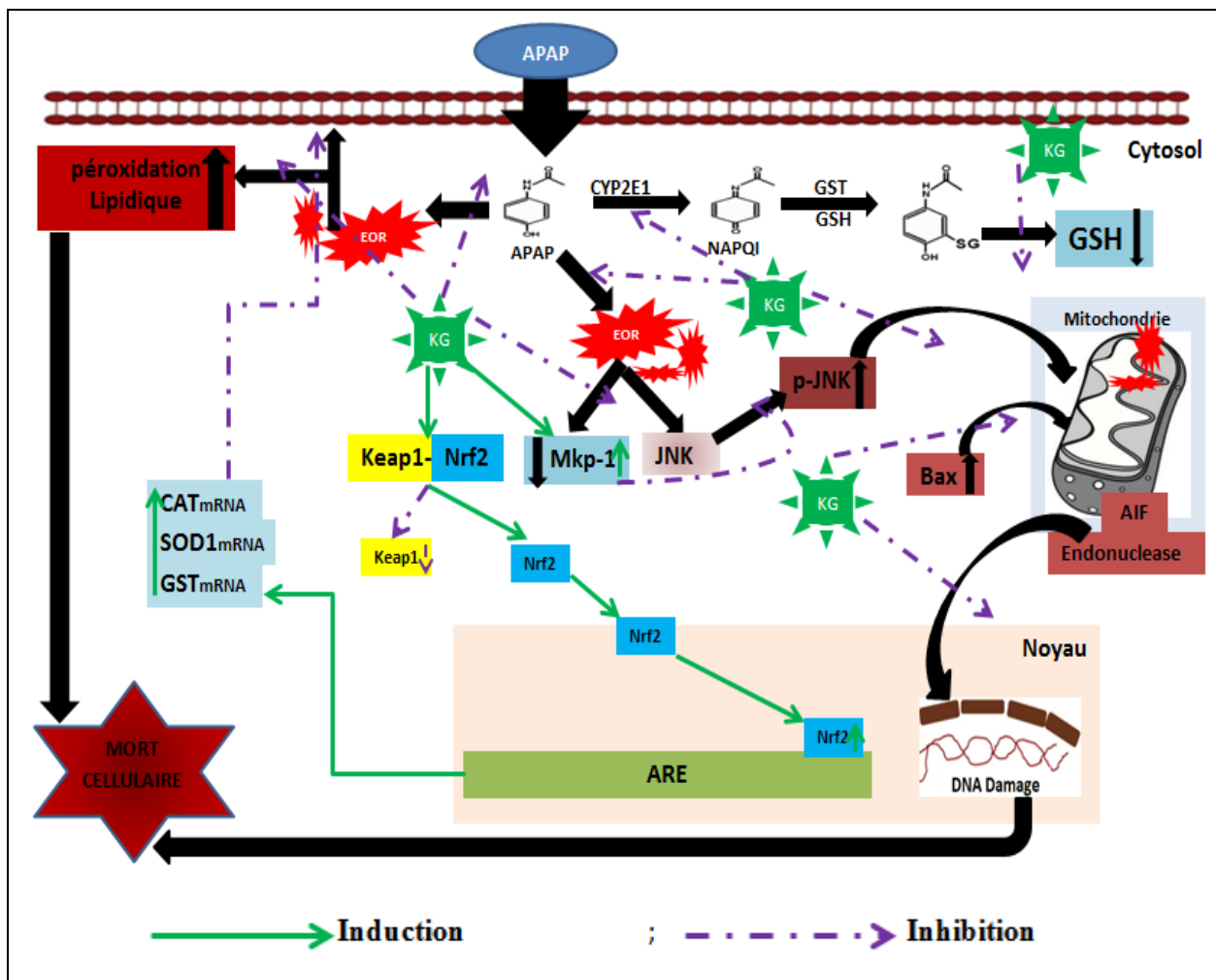


Figure 56: Modèle proposé décrivant les mécanismes moléculaires hépto-protecteurs des limonoïdes de KgF25 contre la toxicité induite par l'APAP

Les limonoïdes isolés de *K grandifoliola* protègent les hépatocytes L-02 contre l'hépatotoxicité induite par l'APAP à travers: l'inhibition du CYP2E1 responsable de la biotransformation de l'APAP; l'inhibition des dommages oxydatifs provoqués par la déplétion du GSH, la surproduction d'EOR et la peroxydation lipidique; l'inhibition de la phosphorylation du JNK via l'induction du Mkp-1 et l'induction des enzymes antioxydants via l'activation de la translocation nucléaire du Nrf2.

Après l'investigation des mécanismes moléculaires anti-hépatotoxiques des composés actifs de KgF25, le troisième objectif dans notre travail a consisté à étudier leurs effets sur l'expression de quelques protéines impliquées dans les interactions VHC-cellule hôte au cours des étapes clés du cycle infectieux du VHC. En effet, l'hépatite virale C affecte environ 3% de la population mondiale (**Mohd-Hanafiah et al., 2013**). Depuis son identification en 1989, le VHC est devenu la principale cause des affections aigüe et chronique du foie, et contribue au développement du carcinome hépatocellulaire, responsable de plus de 500 000 décès annuellement (**Choo et al., 1989; Averhoff et al., 2012**). Le traitement standard basé sur la combinaison de l'interféron avec la ribavirin est associé aux effets secondaires graves, et la résistance aux *Direct-acting Anti-viral Agent* (DAA) est un problème important à cause de leur mécanisme d'action unique ciblant seulement les protéines virales (**Sarrazin et al., 2010; Keating, 2015**). De ce fait, la recherche de nouveaux agents antiviraux s'impose pour faire face à ces problèmes. C'est ainsi que l'effet des limonoïdes isolés de la fraction active KgF25 a été évalué sur les étapes clés du cycle infectieux du VHC en utilisant le système HCVcc.

L'entrée du VHC dans la cellule cible commence par l'interaction des glycoprotéines structurales E1 et E2 de l'enveloppe virale avec plusieurs récepteurs membranaires situés à la surface de la cellule hôte tels que les récepteurs CD81, occludin, claudin-1 et SR-B1 (scavenger receptors class-B type-1); suivi de la fusion de la particule virale avec la membrane plasmique. parmi ces récepteurs, le récepteur CD81 joue un rôle majeur dans ce processus d'entrée (**Belouzard et al., 2011; Cheng et al., 2013**). Dans cette étude, en utilisant le système VHCCcc dérivant du plasmide Jc1/GLuc2A, les limonoïdes de KgF25 ont inhibé l'entrée des particules VHCcc de manière concentration-dépendante (figure 51B) avec les concentrations efficaces 50 (CE₅₀) de $41,60 \pm 4,48 \mu\text{M}$; $50,54 \pm 4,42 \mu\text{M}$ et $41,03 \pm 3,55 \mu\text{M}$ (tableau 9) respectivement pour les composés C-A (17-epi-méthyl-6-hydroxylangolensate), C-B (7-deacétoxy-7-oxogedunin) et C-C (7-deacétoxy-7R-hydroxygedunin). Ces résultats

corroborent avec ceux de **Galani et al. (2016a)** qui ont démontré l'effet inhibiteur de la fraction active de KgF25 sur l'étape d'entrée du VHC (attachement du virus à la surface de la cellule) en utilisant aussi bien les particules virales infectieuses produites en culture cellulaire (VHCcc) que les pseudo-particules du VHC (VHCpp). Afin de rechercher le mécanisme d'inhibition de ces limonoïdes sur l'étape d'entrée du VHC, leur effet sur l'expression du récepteur CD81 a été déterminé. L'analyse par cytométrie en flux (figure 52) montre que le nombre de cellules exprimant le récepteur CD81 après 48 h d'incubation en présence des limonoïdes de KgF25 (50 μ M) a diminué d'environ 75%. Il a été démontré précédemment que l'infection au VHC peut être inhibée par le blocage du récepteur CD81 à l'aide d'anticorps spécifiques (**Wakita et al., 2005; Gottwein et al., 2007**). Pour examiner d'avantage si l'effet inhibiteur de ces limonoïdes sur l'entrée du virus dépend du récepteur CD81, les cellules Huh7.5 ont été prétraitées avec l'anticorps anti-CD81 ou les limonoïdes isolés de KgF25 pendant 1 h avant l'infection. Après 72 h, la détection de la protéine core du VHC par immunofluorescence (figure 55A) et l'activité de la luciférase sécrétée dans le milieu d'incubation (figure 55B) démontrent l'effet inhibiteur des limonoïdes sur l'étape d'entrée du VHC. Ces résultats obtenus avec les cellules prétraitées avec les limonoïdes de KgF25 étaient comparable à ceux obtenus avec les cellules pré-traitées avec l'anticorps anti-CD81. Etant donné que le récepteur CD81 est l'un des récepteurs les plus importants pour l'entrée du VHC, sa suppression par les limonoïdes de KgF25 pourrait être responsable de leur effet inhibiteur sur l'entrée du VHC. En effet, plusieurs autres composés ont eu des effets inhibiteurs sur l'infection du VHC via la suppression ou l'interaction avec le récepteur CD81. L'interféron- α , un composant crucial du traitement standard contre l'infection au VHC, a montré ses effets inhibiteurs via la diminution de l'expression du récepteur CD81 aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (**Kronenberger et al., 2001**). Avec le même mécanisme, le terfenadine, une anti-histamine, et l'acide salicylique inhibent l'infection du VHC via l'interruption de la

liaison entre la glycoprotéine virale E2 et le récepteur CD81 (**Holzer et al., 2008a; Holzer et al., 2008b**). Ainsi, les résultats obtenus ici suggèrent que les limonoïdes de *K. grandifoliola* peuvent être considérés comme des nouveaux inhibiteurs d'entrée virale via la modulation et/ou l'interaction avec le récepteur CD81.

Une fois dans le cytosol, le génome viral est traduit. Les protéines virales non structurales NS3/NS4A, NS4B, NS5A et NS5B se rassemblent pour former le complexe de réplication qui va assurer la synthèse de nouvelles molécules d'ARN viral (**Egger et al., 2002**). La protéine NS5B qui joue le rôle d'ARN polymérase, est l'enzyme clé dans la réplication du VHC (**Liu et al., 2015a; Kumthip and Mannekarm, 2015**). Un grand nombre de protéines hôtes participe à la formation et au fonctionnement du complexe de réplication par des interactions avec les protéines virales. Parmi ces protéines de l'hôte, le *Class III phosphatidylinositol 4-kinase-alpha* (PI4KA) est l'une des plus importantes (**Borawasky et al., 2009**). Il a été démontré que l'inhibition de son expression inhibe la réplication du VHC (**Bianco et al., 2012**). Les protéines cellulaires telles que l'hème oxygenase-1 (HO-1) induit par le facteur de transcription Nrf2 et l'OAS-3 ont été décrites comme des protéines antivirales dans les cellules infectées. Les études précédentes ont démontré que le HO-1 inhibe la réplication en libérant la biliverdine qui améliore l'activation de la voie de signalisation de l'interféron- α (**Lehmann, 2012**). En effet, la liaison de l'interféron- α à son récepteur active la voie de signalisation des Jak/Stat qui forme un complexe avec l'*Interferon stimulated growth factor-3* (ISGF-3) dans le cytosol. Ce facteur de transcription migre par la suite dans le noyau et active l'expression des *Interferon Stimulated Gene* (ISG) parmi lesquels le 2'5'-oligoadenylate synthase-3 (OAS-3), une protéine antivirale qui bloque la réplication en dégradant l'ARN viral génomique (**Sen and Sarkar, 2007**). Dans la présente étude, la détection de la protéine core du VHC par immunofluorescence (figure 54A) et l'activité de la luciférase sécrétée dans le milieu d'incubation (figure 54B) montrent que le traitement des

cellules avec les limonoïdes de KgF25 inhibent la réplication du VHC. Un effet similaire a été observé lorsque les cellules ont été traitées avec le Danoprevir, un DAA utilisé ici comme composé antiviral (inhibiteur de la réplication) de référence. L'effet des limonoïdes de KgF25 et du Danoprevir a ensuite été investigué sur l'expression de la NS5B, du PI4KA et de l'OAS-3 dans le but d'explorer le mécanisme par lequel ces limonoïdes exercent leur effet inhibiteur sur la réplication du VHC. L'analyse western blot (figure 54C et 54D) a révélé que les limonoïdes isolés de KgF25 inhibent l'expression de la protéine NS5B de façon similaire que le Danoprevir. Le traitement des cellules avec le Danoprevir n'a affecté ni l'expression du PI4KA, ni l'expression de l'OAS-3 comparativement aux cellules traitées avec le DMSO. Par contre, dans les cellules traitées avec les limonoïdes, l'expression du PI4KA a significativement ($p < 0,05$) été réduite tandis que le niveau d'expression de l'OAS-3 a augmenté jusqu'à 2,5 fois comparativement aux cellules traitées avec le DMSO (figure 56C et 56D). Ces résultats sont en accord avec les précédentes études rapportant que l'inhibition pharmacologique du PI4KA ou la suppression du gène du PI4KA à l'aide d'ARN interférent inhibe la réplication du VHC (**Borawasky et al., 2009; Bianco et al., 2012**). De même, sur la base que les limonoïdes de *K. grandifoliola* induisent l'expression de l'OAS-3, une protéine qui inhibe la réplication du VHC en dégradant l'ARN viral, nous pouvons suggérer que la voie de signalisation de l'interféron- α est une cible antivirale où agissent les limonoïdes isolés de la fraction active KgF25 de *K. grandifoliola*.

La présente étude a également montré que l'infectivité extracellulaire du VHC a été inhibée par les limonoïdes isolés de KgF25, indiquant ainsi que ces limonoïdes inhibent l'étape d'assemblage du cycle infectieux du VHC, et par conséquent, la libération des nouveaux virions. Dans le but de rechercher le mécanisme d'action de cet effet inhibiteur sur cette étape, l'expression du DGAT-1, une enzyme de la synthèse des triglycérides nécessaire pour le transport de la protéine core du VHC dans les gouttelettes lipidiques (**Herker et al.,**

2010), a été évaluée après le traitement des cellules infectées avec les limonoïdes. Les résultats de l'analyse *western blot* (figure 55) ont montré que les limonoïdes n'ont eu aucun effet sur l'expression du DGAT-1, suggérant ainsi que cette protéine n'est pas une cible antivirale pour les limonoïdes de KgF25 dans l'étape d'assemblage du cycle infectieux du VHC. Cependant, pour d'avantage avoir une idée par rapport à ce mécanisme d'inhibition, il serait intéressant d'analyser l'effet de ces limonoïdes sur l'expression des autres protéines de la cellule hôte nécessaire pour l'étape d'assemblage/libération du cycle infectieux du VHC, parmi lesquelles les protéines de la machinerie de sécrétion des VLDL dont l'Apolipoprotein A e B et le Microsomal Triacylglycerol Transfer Protein (**Jones et McLauchlan, 2010; Huang et al., 2007; Gastaminza et al., 2008**). Au regard des effets multiples des limonoïdes de *K. grandifoliola* sur le cycle infectieux du VHC, nous proposons à la figure 57 un modèle décrivant leurs mécanismes d'action.

Les composés phytochimiques ciblant les protéines hôtes telles que le CD81, le PI4KA et OAS-3 seraient des prototypes idéals pour le développement des composés anti-VHC. Etant donné que le récepteur CD81 et le PI4KA sont des facteurs hôtes essentiels pour le cycle infectieux du VHC, le phénomène de résistance virale pourrait ne plus être un problème. Notre étude a démontré que les limonoïdes de *K. grandifoliola* inhibent l'infection du VHC à travers au moins deux étapes de son cycle infectieux, l'entrée et la réplication, en inhibant l'expression du récepteur CD81 et du PI4KA et en induisant l'expression de l'OAS-3 avec un index thérapeutique supérieur 20. Ceci montre que ces limonoïdes seraient de potentiels composés très attractifs pour le traitement l'hépatite virale C.

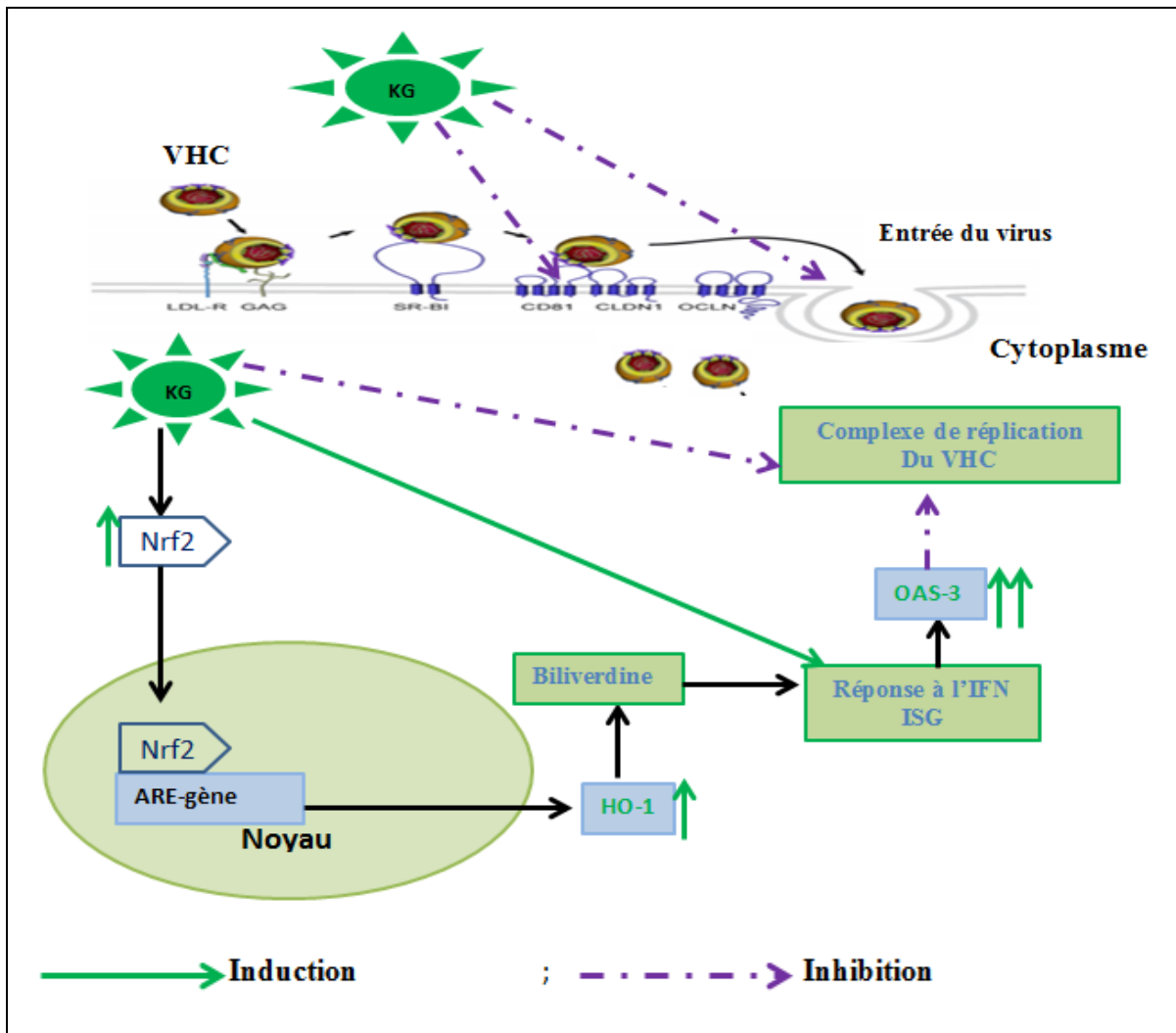


Figure 57: Modèle proposé montrant le mécanisme d'action des limonoïdes de *K. grandifoliola* sur le cycle infectieux du VHC

Les limonoïdes de *KgF25* interfèrent sur l'entrée virale en bloquant l'expression du récepteur CD81, inhibant ainsi la fusion du virus avec la membrane et les étapes en aval. Au niveau intracellulaire, ces limonoïdes activeraient le facteur de transcription Nrf2, conduisant ainsi à l'expression des gènes antioxydants dont l'hème oxygénase-1 (HO-1). La biliverdine issue de l'activité de cette enzyme active l'expression des ISG (Interferon Stimulated Gene) parmi lesquels l'OAS-3, une protéine antivirale qui inhibe l'expression de l'ARN génomique du VHC.

Bien que nous n'ayons pas évalué les paramètres du stress oxydatif dans les cellules infectées au VHC, Il a été démontré que l'infection au VHC est associée au stress oxydatif (Ivanov *et al.*, 2013). En effet, dans le foie des patients infectés au VHC, la concentration en

espèces oxygénées réactives (ROS) est 5 à 10 fois plus élevée comparativement aux personnes en bonne santé (**Bhargava et al., 2011**). On observe également chez les patients VHC positifs une diminution importante du taux de glutathion cellulaire et de l'activité des enzymes antioxydants tels que la superoxyde dismutase et les glutathions peroxydases (**Larrea et al., 1998; Venturini et al., 2010**). L'induction du stress oxydatif dans les cellules infectées au VHC a été imputée à presque toutes les protéines du VHC (**Pal et al., 2010; Ivanov et al., 2011**). La réplication du VHC ou l'expression de sa protéine core conduit au dysfonctionnement mitochondriale, accompagné d'une production massive d'EOR à cause de l'inhibition de la chaîne de transport d'électron; et à la mort des hépatocytes par apoptose (**Korenaga et al., 2005; Ando et al., 2008; Wang et al., 2010**). Toutes ces observations montrent que l'infection au VHC conduit à la destruction du tissu hépatique par les mêmes mécanismes que ceux observés avec les hépatites toxiques. Dans cette étude, nous avons mis en évidence la capacité des limonoïdes de la fraction active KgF25 à inhiber le stress oxydatif induit dans les hépatocytes L-02 par le CCl₄, le cisplatine et l'APAP. Sur ces bases, nous pouvons suggérer que ces composés inhiberaient le stress oxydatif induit dans les cellules Huh7.5 par le VHC; et contribueraient ainsi à la réduction du taux d'infection et de réplication du VHC. Ceci pourrait également expliquer pourquoi les composés tels que la silymarine, la quercétine, la naringénine ou encore l'acide glycyrrhétinique connus pour leurs propriétés anti-hépatotoxiques inhibent efficacement la réplication du VHC (**Gonzalez et al., 2009; Wagoner et al., 2010; Wagoner et al., 2011; Ashfaq et al., 2011; Goldwasser et al., 2011; Matsumoto et al., 2013**). Ces activités anti-VHC et anti-hépatotoxique que possède la silymarine (composé hépato-protecteur de référence) corroborent avec les propriétés anti-hépatotoxiques et anti-VHC des limonoïdes de KgF25 démontrées dans cette étude.

Sur une base structurale, les limonoïdes isolés dans cette étude appartiennent à deux groupes. Le composé A (17-epi-méthyl-6-hydroxyangolensate) est un dérivé du

methylangolensate tandis que les composés B (7-deacetoxy-7-oxogedunin) et C (7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin) dérivent de la gedunin. Plus de 100 limonoïdes différents ont été isolés des plantes et possèdent des activités biologiques variées dont les activités anti-parasitaire, antivirale, anti-tumorale, antioxydant, anti-inflammatoire, neuro-protectrice, anti-plasmodiale, antibactérienne... (Tundis *et al.*, 2014). Le methylangolensate possède une activité anti-inflammatoire via l'inhibition de la voie de signalisation du *Nuclear factor kappa B* (NF-kB) tandis que la Fraxinellone, un produit issu de dégradation des limonoïdes exerce son activité anti-inflammatoire à travers l'inhibition de IKK (IK-B Kinase) et de l'*Extracellular signal-Related Kinase* (ERK1/2) sans toutefois affecter la phosphorylation du JNK et de la protéine P38 (Kim *et al.*, 2009). Les composés B et C qui sont structurellement proche possèdent les activités anti-tumorales à travers la modulation de l'expression de la protéine de choc thermique 90-kD (Tundis *et al.*, 2014). A cause de la grande diversité de structure et d'activité biologique que possèdent les limonoïdes, les études intenses sont nécessaires pour relier le type de structure au mécanisme moléculaire de l'activité biologique. Cependant, la présente étude démontre pour la première fois l'action de deux différents groupes de limonoïdes purifiés de *K. grandifoliola* sur l'expression des facteurs moléculaires promoteurs de l'hépatotoxicité et ceux protecteurs des hépatocytes; et sur l'expression des protéines impliquées dans les interactions cellule hôte-VHC au cours du cycle infectieux du VHC.



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. Conclusion générale

Au terme de ce travail dont l'objectif général était d'étudier *in vitro* quelques mécanismes moléculaires des propriétés anti-hépatotoxique et anti-VHC des composés actifs isolés de la fraction active de *K. grandifoliola*, les conclusions majeures ci-après se dégagent:

- Trois composés actifs responsables en partie des activités anti-hépatotoxique et anti-VHC appartenant à la famille des limonoïdes et connus sous le nom de 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate, 7-deacetoxy-7-oxogedunin et (7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin ont été isolés de la fraction active KgF25.
- Les trois limonoïdes isolés protègent les hépatocytes L-02 contre l'hépatotoxicité induite par le CCl₄, le cisplatine ou l'APAP principalement en inhibant le stress oxydatif, la surexpression du CYP2E1, la phosphorylation du JNK induits par ces agents toxiques et en induisant l'expression du Mkp-1 et l'activation du système de défense antioxydant Nrf2-Keap-1.
- Les trois limonoïdes inhibent l'infection au VHC à travers au moins deux étapes de son cycle infectieux, l'entrée et la réplication. L'inhibition de la réplication virale a été associée à la diminution de l'expression de la protéine virale NS5B, du facteur hôte PI4KA et à l'induction de la protéine antivirale OAS-3. Ces composés inhibent l'entrée du VHC en diminuant l'expression du récepteur membranaire CD81, entraînant ainsi une diminution de l'attachement des particules virales infectieuses à la surface cellulaire.

Ces résultats contribuent ainsi à la valorisation de *K. grandifoliola* comme source de composés potentiels dans le traitement des hépatites et offrent des bases pour des études préclinique et clinique afin de valider ces résultats *in vitro*.

2. Perspectives

A la suite de ce travail, il serait important de poursuivre des études afin de compléter les mécanismes moléculaires de nos composés actifs. Ainsi, nous envisageons:

- D'étudier les interactions entre les composés isolés et leurs protéines cibles.
- D'évaluer l'effet de ces composés sur les autres génotypes du VHC afin de voir s'ils possèdent une activité pan-génotypique et sur les paramètres du stress oxydatif dans les cellules infectées au VHC
- De tester ces composés sur les modèles expérimentaux d'hépatites toxiques *in vivo* et sur des modèles de souris humanisées uPA/SCID permettant une étude *in vivo* de l'hépatite C.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Adeyemi, A., and Gbilade, A. (2006).** Antianaemic activity of *Spondias mombin* and *Khaya grandifoliola* aqueous extracts on rats. *J. Pharmacy. Biores.* 3, 94–97.
- Ando, M., Korenaga, M., Hino, K., Ikeda, M., Kato, N., Nishina, S., et al. (2008).** Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replication cells is restored by reducing viral replication. *Liver int.* 28, 1158-1166.
- Ashfaq, U.A., Javed, T., Nawaz, Z., Riazuddin, S. (2011).** Inhibition of HCV 3a core gene through Silymarin and its fractions. *Viol. J.* 8, 153.
- Atta-ur-Rahman, Zareen, S., Choudhary, M. I., Akhtar, M. N., Khan, S. N. (2008).** α -glucosidase inhibitory activity of Triterpenoids from *Cichorium intibus*. *J. Nat. Prod.* 71, 910-913.
- Averhoff, F.M., Glass, N., Holtzman, D. (2012).** Global burden of hepatitis C: considerations for healthcare provide in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 55:(suppl 1).
- Bajt, M.L., Cover, C., Lemasters, J. J., Jaeschke, H. (2006).** Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol. Sci.* 94, 217-225.
- Bajt, M. L., Farhood, A., Lemasters, J. J., Jaeschke, H. (2008).** Mitochondrial Bax translocation accelerates DNA fragmentation and cells necrosis in murine model of acetaminophen hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324, 8-14.
- Bajt, M. L., Ramachandran, A., Yan, M. H., Lebofsky, M., Farhood A., Lemasters, J. J. et al. (2011).** Apoptosis-inducing factor modulates mitochondrial oxidant stress in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 122, 598-605.
- Bajt, M.L., Knight, T.R., Lemasters, J.J., et al. (2004).** Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N-acetyl-cysteine. *Toxicol Sci.* 80:343-349.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., et al. (2003).** Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *The Journal of Biological Chemistry.* 278, 41624–41630.
- Belouzard, S., Cocquerel, L., Dubuisson, J. (2011).** Hepatitis C virus entry into the hepatocytes. *Cent. Eur. J. Biol.* 6, 1-13.
- Berbata, V.S., Kao, L., Froberg, B. et al. (2010).** A multi-center comparison of the safety of oral versus intravenous acetylcysteine for the treatment of acetaminophen overdose. *Clin. Toxicol.* 48:424-430.

- Bhargava, A., Raghuram, G.V., Pathak, N., Varshney, S., Jatawa, S.K., Jain, D., et al. (2011).** Occult hepatitis C Virus elicits mitochondrial oxidative stress in lymphocytes and triggers PI3-kinase-mediated DNA damage response. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1806-1814.
- Bianco, A., Reghellin, V., Donnici, L., Fenu, S., Alvarez, R. (2012).** Metabolism of phosphatidylinositol 4-kinase III- α dependent PI4P is subverted by HCV and is targeted by 4-anilino quinazoline with antiviral activity. *PLoS Pathog.* 8, e1002576.
- Bickii, J., Njifutie, N., Foyere, J. A., Basco, L. K., Ringwald, P. (2000).** In vitro antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Meliaceae). *J. Ethnopharmacol.* 69, 27–33.
- Borawsky, J., Troke, P., Puyang, X., Gibaja, V., Zhao, S., Mickamin, C. (2009).** Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *J. Virol.* 83, 10059-10074.
- Boutros, T., Nantel, A., Emadali, A., Tzinmas, G., Conzen, S., Chevet, E. et al. (2008).** The MAP Kinase phosphatase-1 Mkp-1/DUSP-1 is a critical regulator of human liver response to transplantation. *Am. J. Transplant.* 8, 2558-2568.
- Brattin, W.J., Glende, E.A., Recknagel, RO. (1985).** Pathological mechanism in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1:27-38.
- Brown, J.M., Ball, J. G., Hogsett, A., Williams, T., Valentinovic, M. (2010).** Temporal study of acetaminophen (APAP) and S-adenosyl-L-methionine (SAME) effects sub-cellular hepatic SAME levels and methionine adenolsyltransferase (MAT) expression and activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 247, 1-9.
- Copple et al., 2008**
- Buege, J., and Aust. S. (1978).** The thiobarbituric acid assay. *Methods Enzymol.* 52, 306-307.
- Bukh, J. (2012).** Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Gastroenterology.* 142, 1279–1283.
- Bumah, V. V, Essien, E.U., Agbedahunsi, M.J., Ekah, O.U. (2005).** Effect of *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) on some biochemical parameters in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 102, 446 – 449.
- CADTH Rapid Response reports (2014).** Triple Therapy for Hepatitis C in Previous Non-responders: A Review of the Clinical Effectiveness and Safety [Internet]. *Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health*, 1–15.
- Cainelli, F. (2012).** Liver diseases in developing countries. *World J Hepatol.* 4(3): 66-67.
- Calland, N., Dubuisson, J., Rouillé, Y., Séron, K. (2012).** Hepatitis C Virus and Natural Compounds : A New Antiviral. *Viruses*, 2197–2217.
- Caro, A.A., and Cederbaum, A.I. (2004).** Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44, 27-42.

- Catanese, M.T., Dorner, M. (2015).** Advances in experimental systems to study hepatitis C virus in vitro and in vivo. *Virology*. 479, 221–233.
- Cederbaum, A.I. (2010).** Hepatoprotective effects of S-adenosyl-L-methionine against alcohol-and cytochrome P450 2E1-induced liver injury. *World J. Gastroenterol.* 16, 1366-1376.
- Chen, S., Zou, L., Li, L., Wu, Tie. (2013).** The protective effect of glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced chronic liver fibrosis in mice via upregulation of Nrf2. *PLoS ONE*. 8(1): e53662. Doi: 10.1371/journal.pone.0053662.
- Cheng, Y.L., Lan, K.H., Lee, W.P., Tseng, S.H., Hung, L.R., Lin, H.C., et al. (2013).** Amiodarone inhibits the entry and assembly steps of hepatitis C virus life cycle. *Clinical Science*. 125, 439-448.
- Chirino, Y.I., Pedraza-Chaverri, J. (2008).** Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp. Toxicol. Pathol.* 61: 223-242.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989).** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral genome. *Science*. 244: 359-362.
- Copple, I.M., Goldring, C.E., Kitteringham, N.R., Park, B.K. (2008).** The Nrf2-Keap1 defence pathways: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology*. 246, 24-33.
- Dai, G., He, L., Chou, N., Wan, Y. J. (2006).** Acetaminophen metabolism does not contribute to gender difference in its hepatotoxicity in mouse. *Toxicol. Sci.* 92, 33-41.
- Dubuisson, J., Cosset, F.L. (2014).** Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. *Journal of Hepatology*. 61, 3–13.
- Egger, D., Wolk, B., Gooert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., Bienz, K. (2002).** Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* 76, 5974-5984.
- Ellman, G. L. (1959).** Plasma antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-7.
- Elsebai, M.F., George, Koutsoudakise-Verónica, S., Gemma, P.V., Ari, T., Sampo, M., et al. (2015).** Pan-genotypic hepatitis C virus inhibition by natural products derived from the wild Egyptian artichoke. *Journal of Virology*. 1–48.
- Falodun, A., Poh, C. F., Adelus, S. A. (2009).** Phytochemical and anti-inflammatory evaluation of khaya grandifoliola stem bark extract. *Int. J. PharmTech Res.* 1, 1061–1064.
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique, Novembre-Décembre*. pp: 108-115.
- Francescato, H.D.C., Costa, R.S., Junior, F.B., Coimbre, T.M. (2007).** Effect of JNK inhibition on cisplatin-induced renal damage. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22, 2138-2148.

- Frese, M., Barth, K., Kaul, A., Lohmann, V. (2002).** Communication Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor- α . *Journal of General Virology*. 1, 1253–1259.
- Galani BRT, Sahuc ME, Sass G, Njayou FN, Loscher C, Mkounga P. et al. (2016a).** *Khaya grandifoliola* C.DC: a potential source of active ingredients against hepatitis C virus *in vitro*. *Arch. Virol.* Doi:10.1007/s00705-016-2771-5.
- Galani, B.R.T., Sahuc, M.E., Njayou, F.N., Deloison, G., Mkounga, P., Feudjou, W.F., et al. (2015).** Plants extracts from Cameroonian medicinal plants strongly inhibit hepatitis C virus infection *in vitro*. *Front. Microbiol.* 6, 488. doi: 10.3389/fmicb.2015.00488.
- Gao, B., Wang, H., Lafdil, F., and Feng, D. (2012).** STAT proteins – key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver. *J hepatol.* 57(2): 430-441.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D. (2003).** Espèces réactives de l’oxygène : Comment l’oxygène peut-il devenir toxique ? *L’actualité chimique, Novembre-Décembre.* pp: 91-96.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., Chisari, F.V. (2008).** Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.* 82, 2120-2129.
- Germain, E., Bonnet, P., Aubourg, L., Grangeponde, M. C., Chajes, V., Bougnoux, P. (2003).** Antracycline induced cardiac toxicity is not increased by dietary omega-3 fatty acids. *Pharmacological research.* 47: 111-117.
- Goldwasser, J., Cohen, P.Y., Lin, W., Kistesberg, D., Balaguer, P., Polyak, S.J., et al. (2011).** Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C Virus particules through a PPAR-mediated mechanism. *J. Hepatol.* 55, 963-971.
- Gonzalez, O., Fontanes, V., Raychaudhuri, S., Loo, R., Loo, J., Arumugaswami, V., et al. (2009).** The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology.* 50, 1756–1764.
- Gottwein, J. M., Scheel, T. K. H., Hoegh, A. M., Lademann, J. B., Eugen-Olsen, J., Lisby, G., Bukh, J. (2007).** Robust hepatitis C genotype 3a cell culture releasing adapted intergenotypic 3a/2a (S52/JFH-1) viruses. *Gastroenterology.* 133, 1614-1626.
- Guengerich, F.P., Kim, D.H., Iwasaki, M. (1991).** Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol.* 4, 168-179.
- Gum, S., and Cho, M. K. (2013).** Recent updates on acetaminophen-hepatotoxicity: the role of Nrf2 in hepatoprotection. *Toxicol. Res.* 29, 165-172.
- Gunawan, B. K., Liu, Z., Han, D., Hanawa, N., Gaarde, W. A., Kaplowitz, N. (2006).** c-Jun N-terminal Kinase plays a major role in murine acetaminophene hepatotoxicity. *Gastroenterology.* 131, 165-178.

- Hammer, M., Mages, J., Dietrich, H., Servatus, A., Howells, N., Cato, A.C. et al. (2006).** Dual Specificity Phosphatase-1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J Exp Med.* 203, 15-20.
- Hanawa, N., Shinohara, M., Saberi, B., Gaarde, W. A., Han, D., Kaplowitz, N. (2008).** Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J. Biol. Chem.* 283, 13565-13577.
- Hashem, F.A., Aboutabl, E.A., EL Souda, S.S., Moharam, M., Maamoum, A.A., Shabana, M. (2013).** Desmutagenic and antimutagenic potential of phenolics from *Khaya grandifoliola*(C.DC.), Meliaceae. *Egyptian Pharmaceutical Journal.* 12, 148–154.
- Henderson, N. C., Pollock, K. J., Frew, J., Mackinnon, A. C., Flavel, R. A., Davis, R. J. et al. (2007).** Critical role of c-Jun (NH2) Terminal Kinase in paracetamol-induced acute liver failure. *Gut.* 56, 982-990.
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaechlcke, K., Rosenberg, A.R., et al. (2010).** Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat. Med.* 16, 1295-1298.
- Hinson, J. A., Roberts, D. W., James, L. P. (2010).** Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 196, 369-405.
- Holzer, M., Ziegler, S., Albrecht, B., Kronenberg, B., Kail, A., Bartenschlager, R., et al. (2008a).** Identification of terfenadine as an inhibitor of human CD81 receptor HCV-E2 interaction: synthesis and structure optimization. *Molecules.* 13, 1081-1110.
- Holzer, M., Ziegler, S., Neugebauer, A., Kronenberg, B., Klein, C.D., Hartmann, R.W. (2008b).** Structural modification of salicylates: inhibitors of human CD81 receptor HCV-E2 interaction. *Arch. Pharm.* 341:478-484.
- Hong, K.O., Hwang, J.K., Park, K.K., Kim, S.H. (2005).** Phosphorylation of c-Jun N-terminal Kinases (JNKs) is involved in the preventive effect of Xanthorrhizol on cisplatin-induced hepatotoxicity. *Arch. Toxicol.* 79: 231-236.
- Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Ye J. (2007).** Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 5848-5853.
- Hutchinson, J., Dalziel, J.M. (1978).** *Flora of West Tropical Africa. Crown Agents for Overseas Government and Administration*, Millbank, London SW1, UK, 345–320.
- Ishida, S., Kaito, M., Kohara, M., Tsukiyama-Kohora, K., Fujita, N., Ikoma, J. et al. (2001).** Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatology Research*, 20, 335–347.
- Ivanov, A.V., Bartosch, B., Smirnova, A.O., Isaguliants, M.G., and Kochetkov, S.N. (2013).** HCV and oxidative stress in the Liver. *Viruses.* 5, 439-469.

- Ivanov, A.V., Sminova, O.A., Ivanova, O.N., Masalova, O.V., Kochetkov, S.N., Isagulians, M.G. (2011).** Hepatitis C Virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent in HUH7 cells. *PLoS One*. 6, e24957.
- Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D., Lemasters, J. J. (2002).** Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65, 166-176.
- Jaeschke, H., Knight T. R., Bajt M. L. (2003).** The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicological letters*. 144: 279-288.
- Jaeschke, H., McGill, M. R., Ramachandran, A. (2012).** Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* 44, 88-106.
- Jaeschke, H., Williams, C. D., McGill, M. R., Xie, Y., Ramachandran, A. (2013).** Models of drug-induced liver injury for evaluation of phytotherapeutics and other natural products. *Food Chem Toxicol.* 55, 279-289.
- Jaiswal, A. K. (2004).** Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1199-1207.
- James, L.P., Mayeux, P.R., Hinson, J.A. (2003).** Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispo.* 31, 1499-1506.
- Jimenez-Lopez, J.M., Cederbaum, A.I. (2005).** CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity: role in ethanol-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 1, 671-685.
- Jin, X., Cong, T., Zhao, L., Ma, L., Li, R., Zhao, P., et al. (2015).** The protective effects of masson pine pollen aqueous extract on CCl₄-induced oxidative damage of human hepatic cells. *Int J Clin Exp Med.* 8, 17773-17780.
- Jones, D.M., and McLauchlan, J. (2010).** Hepatitis C Virus: assembly and release of virus particles. *J. Biol. Chem.* 285, 22733-22739.
- Kaiiska, M. B., Gladen, B. C., Baird, D. D. (2000).** Biomarkers of oxidative stress study: are plasma antioxidants markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic. Biol. Med.* 28, 838-845.
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirita, H., Karin, M. (2005).** Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinases phosphatases. *Cell.* 120, 649-661.
- Kass, G.E., Macanas-Pirard, P., Lee, P.C., Hinton, R.H. (2003).** The role of apoptosis in acetaminophen-induced injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010, 557-559.
- Kasugai, S., Hasegawa, N., Ogura, H. (1991).** Application of the MTT colorimetric assay to measure cytotoxic effects of phenolic compounds on established rat dental pulp cells. *Journal of Dental Research.* 70, 127-130.

- Kato, N., Sugiyama, K., Namba, K., Dansako, H., Nakamura, T., Takami, M., et al. (2003).** Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 306, 756–766.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Mizokami, M., Wakita, T. (2005).** Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *Journal of Virology*. 79, 592–596.
- Keating, G.M. (2015).** Ledipasvir/sofosbuvir: a review of its use in chronic hepatitis. *C. Drugs*. 75:675-685.
- Keyse, S. M. (2000).** Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12, 186-192.
- Kim, R.Y., Lee, N.J., Ban, J.O., Yoo, S.H., Lee, M.Y., Yoon, P.Y., et al. (2013).** Curative effect of Thiacremonone against acetaminophen-induced acute hepatic failure via inhibition of proinflammatory cytokines production and infiltration of cytotoxic immune cells and Kupffer cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. Article ID 974794, 13 pages.
- Kim, W., Fan, Y. Y., Smith, R., Patil, B., Jayaprakasha, G. K., et al. (2009).** Dietary curcumin and limonin suppress CD4+ T-cell proliferation and interleukin-2 production in mice. *J. Nutr.* 139, 1042–1048.
- Korenaga, M., Wang, T., Li, Y., Showalter, L.A., Chan, T., Sun, J., et al. (2005).** Hepatitis C Virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J. Biol. Chem.* 280, 37481-37488.
- Kronenberg, B., Ruster, B., Elez, R., Weber, S., Puper, A., Lee, J.H., et al. (2001).** Interferon alpha down-regulated CD81 in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 33, 1518-1526.
- Kumari, A., and Kakkar, P. (2012a).** Lupeol prevents acetaminophen-induced in vivo hepatotoxicity by altering Bax/Bcl-2 and oxidative stress-mediated mitochondrial signaling cascade. *Life Sci*. 90, 561-570.
- Kumari, A., and Kakkar, P. (2012b).** Lupeol protects against acetaminophen-induced oxidative stress and cell death in rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1781-1789.
- Kumthip K, and Maneekarm, N. (2015).** The roles of HCV proteins on treatment outcomes. *Virol. J.* 12, 217.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Lan, K.H., Wang, Y.W., Lee, W.P., Lan, K.L., Tseng, S.H., Hung, L.R., et al. (2012).** Multiple effects of Honokiol on the life cycle of hepatitis C virus. *Liver International*, 32, 989–997.

- Larrea, E., Beloqui, O., Munoz-Navas, M.A., Civeira, M.P., Prieto, J. (1998).** Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1235-1241.
- Legrand-Abrevanel, F. (2008).** Implications therapeutiques de la variabilite genetique des genotypes 4 et 5 du virus de l'hepatite C. *These de Doctorat, Universite Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, France, 1-186.*
- Lehmann, E., El-Tantawy, W.H., Ocker, M., Barthenschlager, R., Lohmann, V., Hashemolhosseini, S., et al. (2012).** The heme oxygenase 1 product biliverdin interferes with hepatitis C virus replication by increasing antiviral interferon response. *Hepatology.* 51:398–404.
- Liao, Y., Lu, X., Lu, C., Li, G., Jin, Y., Tang, H. (2008).** Selection of agents for prevention of cisplatin-induced hepatotoxicity. *Pharmacol. Res.* 52(2): 125-131.
- Lieber, C. S. (2002).** S-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 1183S-1187S.
- Lieber, C.S. (1997).** Cytochrome P-450E1: Its physiological and pathological role. *Physiol Rev.* 77, 517-544.
- Lim, D.W., Kim, H., Park, J.Y., Kim, J.E., Moon, J.Y., Park, S.D., et al. (2016).** *Amonum Cardamomum* L. Ethyl acetate fractions protects against carbon tetrachloride-induced liver injury via an antioxidant mechanism in rats. *BMC complemt. Altern. Med.* 16, 155.
- Lin, J., Schyschka, L., Mühl-Benninghaus, R., Neumann, J., Hao, L., Nussler, N. (2012).** Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism. *Arch. Toxicol.* 86, 87–95.
- Lindenbach, B.D. (2009).** Measuring HCV infectivity produced in cell culture and in vivo. *Methods Mol. Biol.* 510, 329-336.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wölk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., et al. (2005).** Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science.* 309, 623–626.
- Liu, D., Ji, J., Ndongwe, T.P., Michailidis, E., Rice, C.M., Ralston, R., Sarafianos, S.G. (2015a).** Fast Hepatitis C virus RNA elimination and NS5A redistribution by NS5A inhibitors studied by a multiplex assay approach. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3482-3492.
- Liu, S., Chen, R., Hagedorn, C.H. (2015b).** Tannic Acid Inhibits Hepatitis C Virus Entry into Huh7.5 Cells. *PloS one.* 10, e0131358.
- Liu, Y., Bi-man, L., Jin-Yong, P. (2011).** Hepatoprotective activity of the total flavonoids from *Rosa laetivigata* Michx fruit in mice treated by paracetamol. *Food chemistry.* 125, 719-725.

- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R. (1999).** Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 285, 110–113.
- Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I., Sumaya-Martínez, M. T., Gutiérrez-Salinas, J., Bautista, M. et al. (2014).** Review of natural products with hepatoprotective effects. *World J. Gastroenterol.* 20, 14787–14804.
- Makinde, J. M., Awe, S. O., Agbedahunsi, J. M. (2006).** Effect of *Khaya grandifoliola* extract on *Plasmodium berghei* in mice. *Phytother. Res.* 2, 30–32.
- Manov, I., Hirsh, M., Iancu, T.C. (2004).** N-acetylcysteine does not protect HepG2 cells against acetaminophen-induced apoptosis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 94, 213–225.
- Marribe, E. N. (1999).** ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE HUMAINES, 4^e édition. *De Boeck Université*. 765p.
- Mates J. M., Perez-Gomes C. et Munez de castro I. (1999).** Antioxydant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 32: 595-603.
- Mathew, J., Galaeneau, L., Loranger, A., Gilbert, S., Marceau, N. (2008).** Keratin-protein kinase C interaction in reactive oxygen species-induced hepatic cell death through mitochondrial signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 413-424.
- Matsumoto, Y., Matsuura, T., Aoyagi, H., Matsuda, M., Hmwe, S.S., Date, T., et al. (2013).** Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. *PloS one*, 8, e68992.
- Mauss, S., Berg, T., Rockstroh, J., Sarrazin, C. & Wedemeyer, H. (2013).** *Short Guide to Hepatitis C*, Flying Pub. (ed. by Mauss, Berg, Rockstroh, Sarrazin, and Wedemeyer) Flying Publisher, Cologne, Germany, 1-173.
- McGill, M.R., Sharpe, M.R., Williams, C.D., Taha, M., Curry, S.C., Jaeschke, H. (2012).** The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J. Clin. Invest.* 122, 574–1583.
- McGill, M.R., Yan, H.M., Ramachandran, A., Murray, G.J., Rollins, D.E., Jaeschke, H. (2011).** HepaRG cells: A human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 53, 974–982.
- Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.T., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., et al. (2001).** Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature Medicine*. 7, 927–933.
- Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractères prooxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur, Paris, France*. pp: 13-36.

- Miller, A., Horiguchi, N., Won-II, J., Radaeva, S., and Gao, B. (2011).** Molecular mechanisms of alcoholic liver disease: Innate immunity and cytokines. *Alcoholic Clin Exp Res.* 35(5): 787-793.
- Mohd-Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A.D., Wiersma, S.T. (2013).** Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology.* 57, 1333–1342.
- Moradpour, D., Penin, F., Rice, C.M. (2007).** Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:453-463.
- Moundipa, P. F., Njyou, F. N., Yanditoum, S., Sonké, B., Tchouanguep, F.M. (2002).** Medicinal plants used in Bamun region of the western province of Cameroon against Jaundice and other liver disorders. *Cam. J. Biochem. Sci.* 12, 39-46.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J. (1982).** Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research.* 42, 3858–3863.
- Nakagawa, H., Maeda, S., Hikiba, Y., Ohmae, T., Shibata, W., Yanai, A., et al. (2008).** Deletion of apoptosis signal-regulating kinase-1 attenuates acetaminophen-induced liver injury by inhibiting c-Jun N-terminal kinase activation. *Gastroenterology.* 135, 1311-1321.
- Ni, H.M., Bockus, A., Boggess, N., Jaeschke, H., Ding, W.X. (2012).** Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology.* 55, 222–232.
- Nicot, F. (2010).** Variabilité génétique du virus de l'hépatite C et persistance virale. *Thèse de Doctorat, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, France, 1-246.*
- Ninomiya, K., Miyazawa, S., Ozeki, K., Matsuo, N., Muraoka, O., Kikuchi, T., et al. (2016).** Hepatoprotective limonoids from Andiroba (*Carapa guianensis*). *Int. J. Mol. Sci.* 17, 591. doi: 10.3390/ijms17040591.
- Niture, S. K., Kaspar, J. W., Shen, J., Jaiswal, A. K. (2010).** Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244, 37-42.
- Njyou, F. N., Amougou, A. M., Tsayem, R. F., Manjia, J. N., Rudraiah, S., Bradley, B. et al. (2015).** Antioxidant fractions of khaya grandifoliola C.DC. and Entada africana Guill et Perr. Induce nuclear translocation of Nrf2 in HC-04 cells. *Cell Stress Chaperon.* Doi:10.1007/s1219-015-0628-6.
- Njyou, F. N., Galani, T. B. R., Ngadjui, T. B., Moundipa, F. P. (2013).** Hepatoprotective activity of three Cameroonian medicinal plants against oxidative damages induced by paracetamol and CCl₄ in primary rat hepatocytes. *Int. J. Pharmacy Photon.* 104, 306–314.
- Njyou, F. N., Kouam, A. F., Simo, F. B. N., Tchana, A. N., Moundipa, P.F. (2016).** Active chemical fractions of stem bark extract of Khaya grandifoliola C.DC. and Entada

africana Guill et Perr. Synergistically protect primary rat hepatocytes against paracetamol-induced damage. *BMC Complement. Altern. Med.* 16:190, Doi:10.1186/s12906-016-1169-y.

Njouom, R., Texier, G., Fontanet, A. (2015). O-02 Prevalence of hepatitis B, hepatitis C and hepatitis D virus infections in Cameroon: results from a national population based survey (The ANRS 12289 project). *Journal of Viral Hepatitis.* 22, 1–1.

Nourjah, P., Ahmad, S. R., Karwoski, C., Willy, M. (2006). Estimates of acetaminophen (Paracetamol)-associated overdoses in the United States. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 15, 398-405.

Odugbemi, T. O., Akinsulure, R. O., Aibinu, E. I., Fabeku O. P. (2007). Medicinal plants useful for malaria therapy in Okeigbo, Ondo State, South West Nigeria. *Afr. J.Trad. CAM.* 4, 191-198.

Olowokudejo, J. D., Kadiri, A. B., Travih, V. A. (2008). An ethnobotanical survey of herbal markets and medicinal plants in Lagos State of Nigeria. *Ethnobotanical leaflets.* 12: 851-65.

Omar, A.H., Mohamed, W.R., Arabn H.H., Arafa, A.E. (2016). Tangerretin alleviates Cisplatin-induced acute hepatic injury in rats: Targeting MAPKS and apoptosis. *PLoS ONE.* 11(3): e0151649.

OMS (2015). Hépatite C. *Aide-mémoire.* 164, 2–5.

Onifade, A. K. (2006). Effect of essential oils of some Meliaceae plants on aflatoxin production and growth of *Aspergillus parasiticus*. *J. Food. Technol.* 4, 322–324.

Pal, S., Polyak, S.J., Bano, N., Qiu, W.C., Carithers, R.L., Shuhart, M. et al. (2010). Hepatitis C Virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 627-634.

Palipoch, S., Punsawad, C. (2013). Biochemical and histological study of rat liver and kidney injury induced by cisplatin. *J. Toxicol. Pathol.* 26(3): 293-299.

Palipoch, S., Punsawad, C., Koomhin, P., Suwannalert, P. (2014). Hepatoprotective effect of curcumin and alpha-tocopherol against cisplatin-induced oxidative stress. *BMC Complement. Altern. Med.* 14:111.

Pang, C., Zheng, Z., Shi, L., Sheng, Y., Wei, H., Wang, Z. et al. (2016). Cafeic acid prevents acetaminophen-induced liver injury by activating the Keap1-Nrf2 antioxidative defense system. *Free Radic. Biol. Med.* 91, 236-246.

Park, B. K., Kitteringham, N. R., Maggs L. L., Pirmohamed M., Williams D. P. (2005). The role of metabolic activation in drug induced hepatotoxicity. *Annual Review of pharmacology and Toxicology.* 45: 177-202.

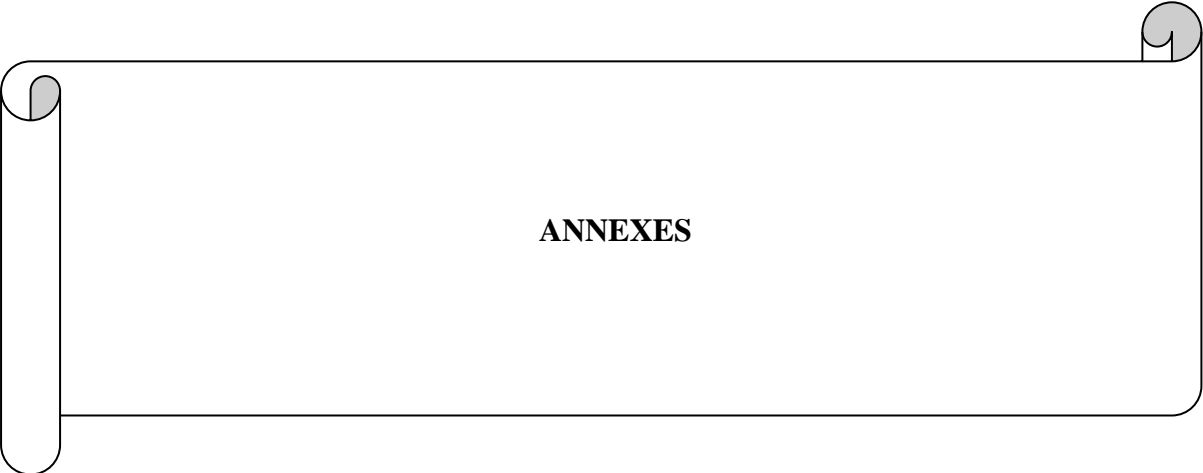
Pawlotsky, J. (2013). Review: NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *Journal of Hepatology,* 59, 375–382.

- Pestka, S., Krause, C. D. Walter, M.R. (2004).** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*. 202, 8–32.
- Phan, T., Beran, R.K.F., Peters, C., Lorenz, I.C., Lindenbach, B.D. (2009).** Hepatitis C virus NS2 protein contributes to virus particle assembly via opposing epistatic interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzymes complexes. *J. Virol.* 83, 8379-8395.
- Popescu, C., Dubuisson, J. (2010).** Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biology of the Cell*. 102, 63-74.
- Pratibha, R., Sameer, R., Rataboli, P.V., Bhiwgade, D.A., Dhume, C.Y. (2006).** Enzymatic studies of cisplatin-induced oxidative stress in hepatic tissue of rat. *Eur. J. Pharmacol.* 532: 290-293.
- Recknagel, RO., Glende, E.A., Dolack, J.A., Waller, R.L. (1989).** Mechanisms of carbone tetrachloride toxicity. *Pharmacol. Ther.* 43(1): 139-154.
- Reitman, S., and Frankel, S. (1957).** A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic acid, glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56-58.
- Renart, J., Reiser, J., Stark, G.R. (1979).** Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Pro Natl Acad Sci USA*. 76, 3116-3120.
- Saito, C., Lemasters, J. J., Jaeschke, H. (2010).** c-Jun N-terminal Kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 246, 8-17.
- Sanchez-Perez, I., Martinez-Gomariz, M., Williams, D., Keyse, S.M., Perona, R. (2000).** CL100/MKP1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene*. 19, 5142-5152.
- Sarker, A., Nasreen, M., Islam, R., Ahmed, T., Rahman, F. (2014).** A Minireview: Molecular Understanding of HCV Infection Mechanism. *Journal of Microbiology Research*, 4, 43–53.
- Sarrazin, C.Z.S. (2010).** Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 138:447-462.
- Schaefer, M., Mauss, S. (2008).** Hepatitis C treatment in patients with drug addiction: Clinical management of interferon-alpha-associated psychiatric side effects. *Curative Drug Abuse Review*. 1, 177-187.
- Schnackenberg, L. K., Chen, M., Sun, J., Holland, R. D., Dragan, Y., Tong, W. et al. (2009).** Evaluation of trans-sulfuration pathways in multiple liver toxicity studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235, 25-32.

- Sen, G. C., and Sarkar, S. N. (2007).** The interferon-stimulated genes targets of direct signaling by interferon double-stranded RNA and virus. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 316, 233-250.
- Shyamal, S., Latha, P.G., Suga, S.R., Shine, V.J., Anuja, G.I., Sini, S., et al. (2010).** Hepatoprotective effect of three herbal extracts on aflatoxin B1-intoxicated rat liver. *Singapore Medicine Journal*. 51, 326-331.
- Simmonds, P., Bukh, C., Combet, G., Deleage, N., Enomoto, S., Feinstone, P. et al. (2005).** Consensus proposals for a unified system of Genotypes., nomenclature of hepatitis C virus. *Hepatology*. 42, 962–973.
- Singh, R., Wang, Y., Tanaka, K. E., Gaarde, W. A., Czaja, M. J. (2009).** Differential effects of JNK1 and JNK2 inhibition on murine steatohepatitis and insulin resistance. *Hepatology*. 49, 87-96.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., et al. (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. 150, 76-85.
- Sohn, J.H., Han, L.K., Kim, J.H., Rukayadi, Y., Wang, J.K. (2008).** Protective effect of macelignan on cisplatin-induced hepatotoxicity is associated with JNK activation. *Biol. Pharm. Bull.* 31(2): 273-277.
- Steinmann, E., Pietschmann, T. (2013).** *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*, (ed. by R. Bartenschlager) Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Stephen, U. A., Abiodun, F., Osahon, A., Ewaen, E. (2009).** Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Khaya grandifoliola* stem bark. *J. Biol. Sci.* 9, 63–67.
- Strober, W. (2001).** Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, Appendix 3, Appendix 3B.
- Tanaka, Y., sakamoto, A., Inoue, T., Kikuchi, T., Kajimoto, T., Muraoko, O. et al. (2012).** Andiolides H-P from flower of andiroba (*Carapa guianensis*, (Meliaceae). *Tetrahedron*. 68, 3669-3677.
- Tanaka, Y., Yamada, T., In, Y., Muraoko, O., Kajimoto, T., Tanaka, R. (2011).** Absolute stereostructure of Andiolides A-G from the flowers of *Carapa Guianensis* (Meliaceae). *Tetrahedron*. 67, 782-792.
- Tellinghuisen, T. L., and Rice, C. M. (2002).** Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 419-427.
- Tews, B.A., Popescu, C., Dubuisson, J. (2010).** Last stop before exit hepatitis C assembly and release as antiviral drug targets. *Viruses*. 2, 1782-1803.

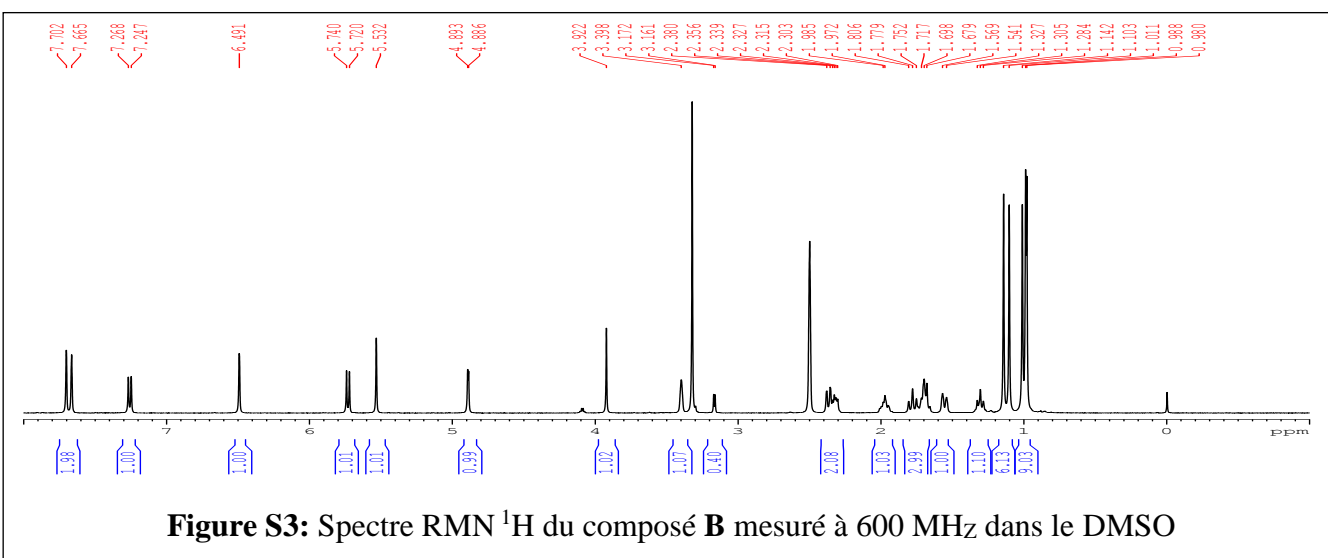
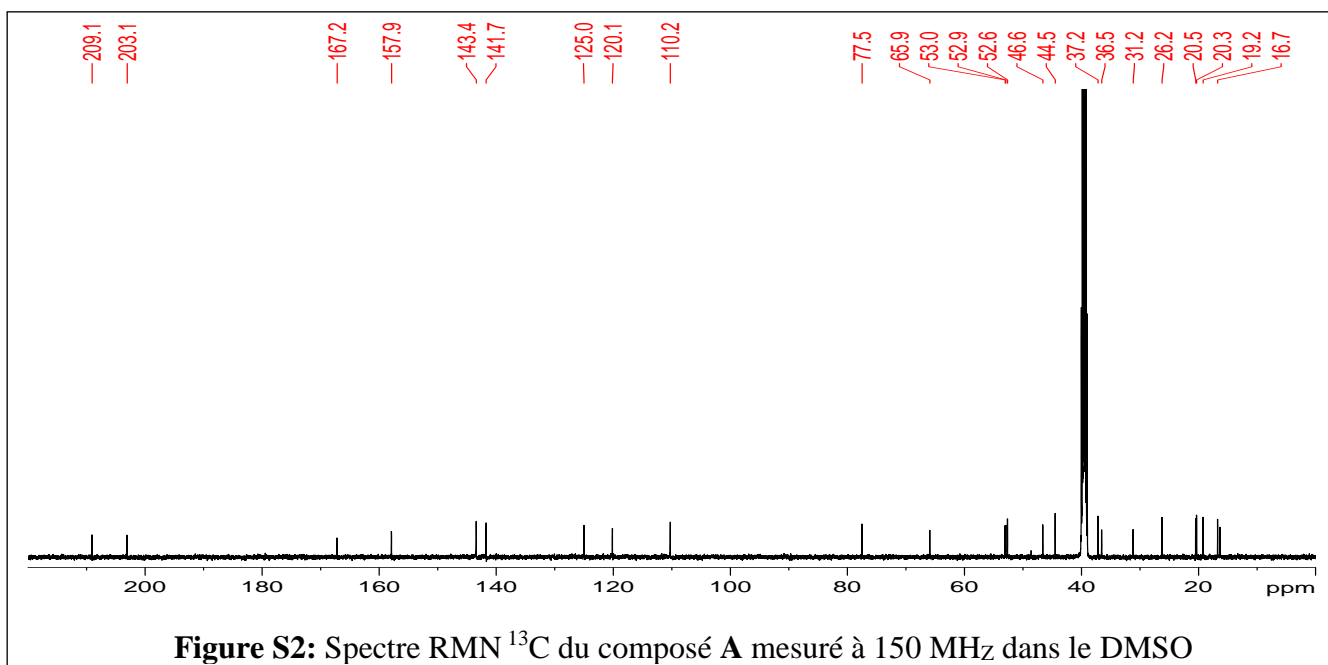
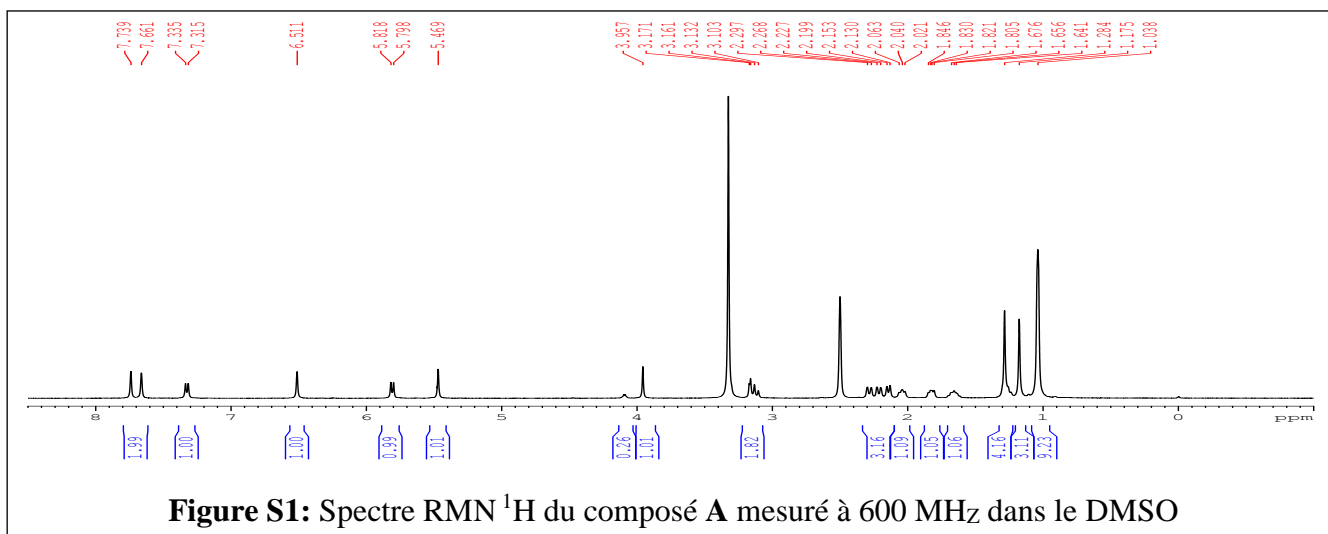
- Tomasi, M. L., Ramani, K., Lopitz-Otsoa, F., Rodriguez, M. S., Li, T. W., Ko, K., et al. (2010).** S-adenosylmethionine regulates dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase expression in mouse and human hepatocytes. *Hepatology*. 51, 2152–61.
- Towbin, H., Stehelin, T., Gordan, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76, 4350-4354.
- Tundis, R., Loizzo, R. M., Menichini, F. (2014).** An overview on chemical aspects and potential benefits of limonoids and their derivatives. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 54, 225-250.
- Tunon, M.J., Alvarez, M., Culebras, J.M., Gonzalez-Gallego, J. (2009).** An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J. Gastroenterol.* 15, 3086-3098.
- Venturini, D., Simao, A.N., Barbosa, D.S., Lavado, E.L., Narciso, V.E., Dichi, I., et al. (2010).** Increased oxidative stress, decreased total antioxidant capacity, and iron overload in untreated patients with chronic hepatitis C. *Dig. Dis. Sci.* 55, 1120-1127.
- Vieyres, G., Pietschmann, T. (2013).** Entry and replication of recombinant hepatitis C viruses in cell culture. *Methods*. 59, 233–248.
- Wagoner, J., Morishima, C., Graft, T.N., Oberlies, N.H., Teissier, E., Pécheur, E.I., et al. (2011).** Differential *in vitro* effects of intravenous versus oral formulations of silibinin on the HCV life cycle and inflammation. *PLoS One*. 6, e16464.
- Wagoner, J., Negash, A., Kane, O.J., Martinez, L.E., Nahmias, Y., Bourne, N., et al. (2010).** Multiple Effects of Silymarin on the Hepatitis C Virus Life Cycle. *Hepatology*. 51, 1912–1921.
- Wahyuni, S.T., Widayawaruyanti, A., Inge, M., Fuad, A., Fuchino, H., Kawahara, N., et al. (2014).** Inhibition of hepatitis C virus replication by chalepin and pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves. *Fitoterapia*, 99, 276–283.
- Wahyuni, T., Tumewu, L., Permanasari, A., Apriani, E., Adianti, M., Rahman, A., et al. (2013).** Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus. *Virology Journal*. 10, 259. doi: 10.1186/1743-422X-10-259
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., et al. (2005).** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine*. 11, 791–796.
- Wancket, L. M., Meng, X. M., Rogers, L. K., Liu, Y. (2012).** Mitogen-activated protein kinase phosphatase (Mkp)-1 protects mice against acetaminophen-induced hepatic injury. *Toxicol Pathol.* 40, 1095-1105.

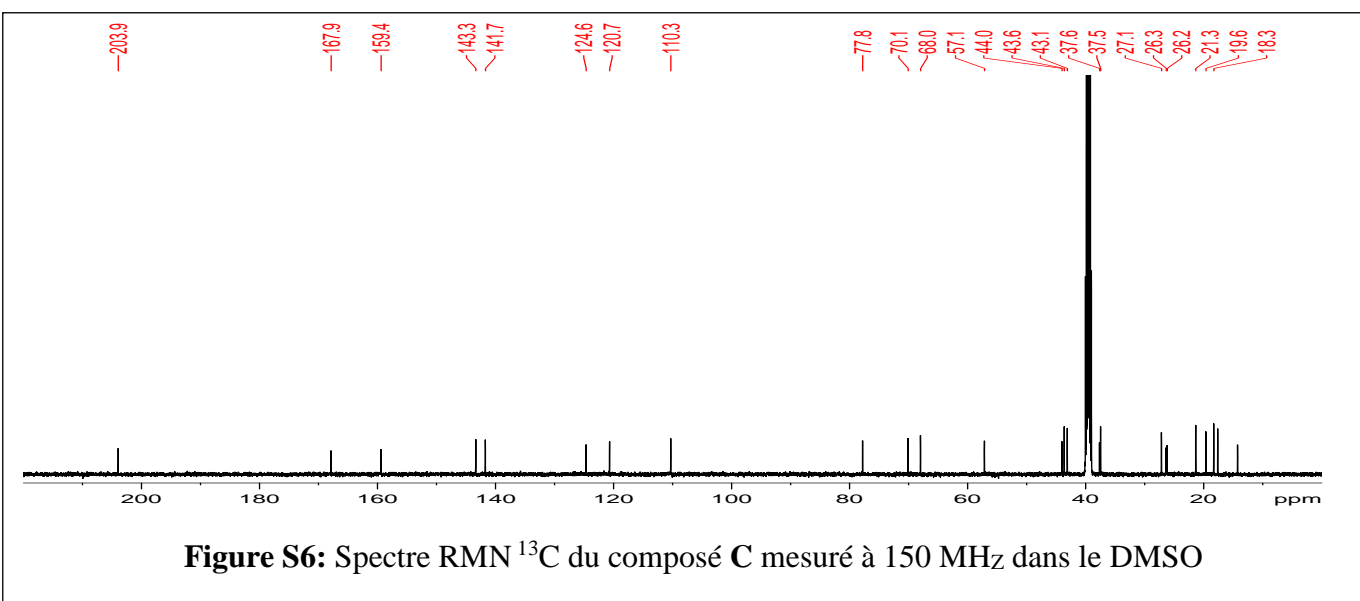
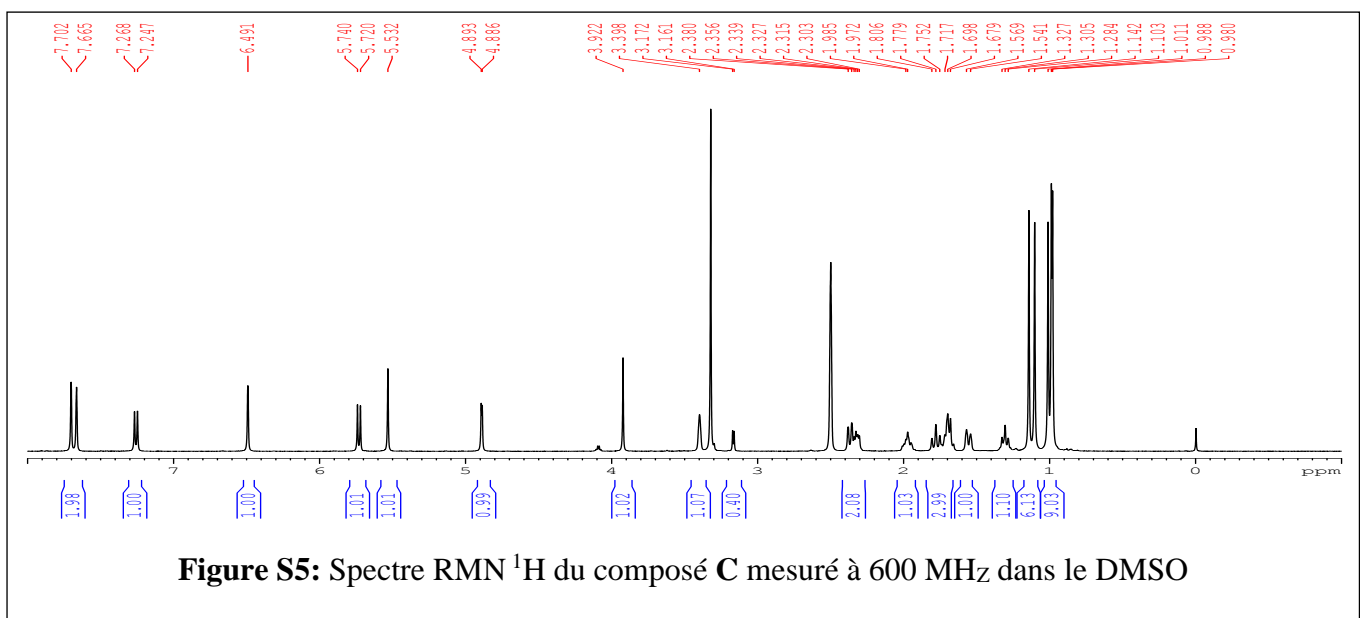
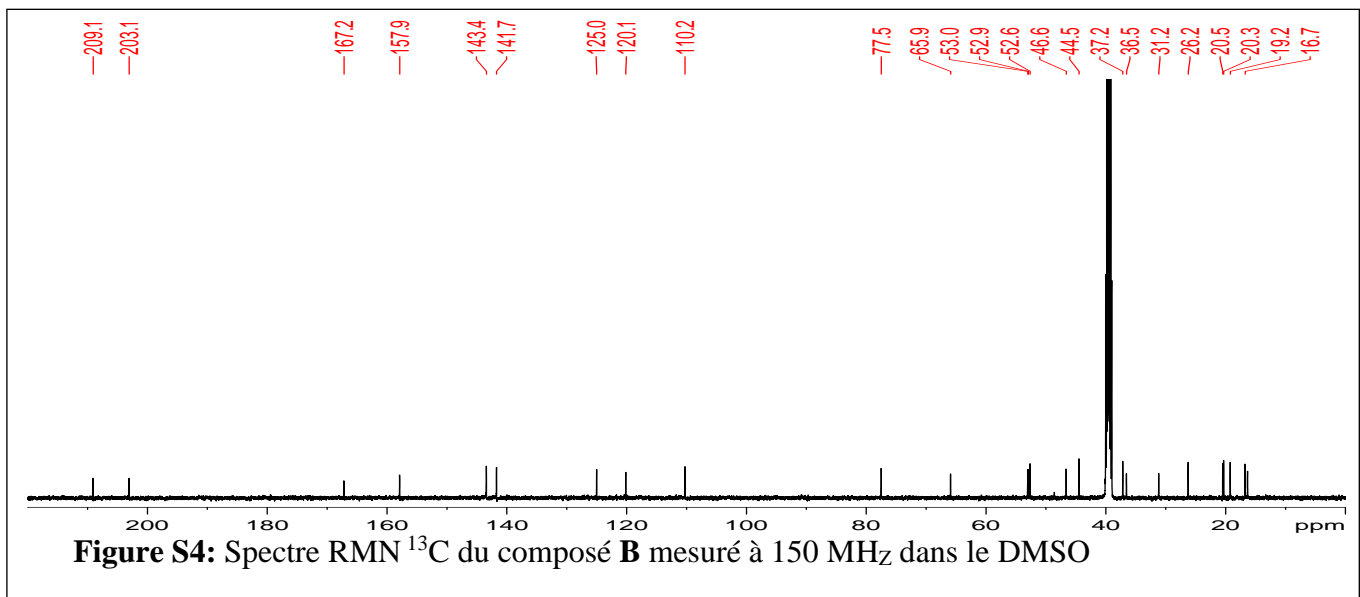
- Wang, T., Campbell, R.V., Yi, M.K., Lemon, S.M., Weinman, S.A. (2010).** Role of hepatitis C virus core proteins in viral-inducing mitochondrial dysfunction. *J. Viral. Hepat.* 17, 784-793.
- Woerz, I., Lohmann, V., Bartenschlager, R. (2009).** Hepatitis C Virus Replicons : Dinosaurs Still in Business ? *Journal of Viral Hepatitis.* 16, 1–9.
- Wu, S.F., Lin, C.K., Chuang, Y.S., Chang, F.R., Tseng, C.K., Wu, Y.C., Lee, J.C. (2012).** Anti-hepatitis C virus activity of 3-hydroxy caruilignan C from *Swietenia macrophylla* stems. *Journal of Viral Hepatitis.* 19, 364–370.
- Xiao J., Liang E. C., Ching P. Y., Chung C. R., Kwok F. S., Lung Fung M. et Tipoe G. L. (2012b).** *Lycium barbarum* polysaccharides protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and necro-inflammation. *Journal of Ethnopharmacology.* 139, 462-470.
- Xiao, F., Li, Y., Luo, L., Xie, Y., Zeng, M., Wang, A. et al. (2014).** Role of mitochondrial electron transport chain dysfunction in Cr(IV)-induced cytotoxicity in L-02 hepatocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 33, 1013-1025.
- Xiao, J., Emily, C., Liang, Ming-Tot, L., Yick-Pang, C., Man-Lung, F., and Tipoe G.L. (2012a).** S-allylmercaptocysteine reduces carbone tetrachloride-induced hepatic oxidative stress and necro-inflammation via nuclear factor kappa-B dependent pathways in mice. *Eur J Nutr.* 51: 323-333.
- Xie, Y., McGill, M. R., Dorko, K., Kumer, S. C., Schmitt, T. M., Forster, J. et al. (2014).** Mechanisms of acetaminophen-induced cell death in primary human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279, 266-274.
- Yang C.S., Yoo, J.S., Ishizaki, H., Hong, J.Y. (1990).** Cytochrome P450IIE: Roles in nitosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab Rev.* 22, 147-159.
- Yuan T, Zhu R, Zhang H, Odeku OA, Yang S, Liao S, Yue J (2010).** Structure determination of grandifotane A from *Khaya grandifoliola* by NMR, X-ray diffraction, and ECD calculation. *Org Lett* 12:252–255.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., et al. (2005).** Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 102, 9294–9299.
- Zhu, W., Fung, P.C.W. (2000).** The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl₄-induced acute liver injury in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 29:870-880.



ANNEXES

Annexes 1: Spectres RMN des composés isolés





Annexes 2: Spectres SMHR des composés isolés

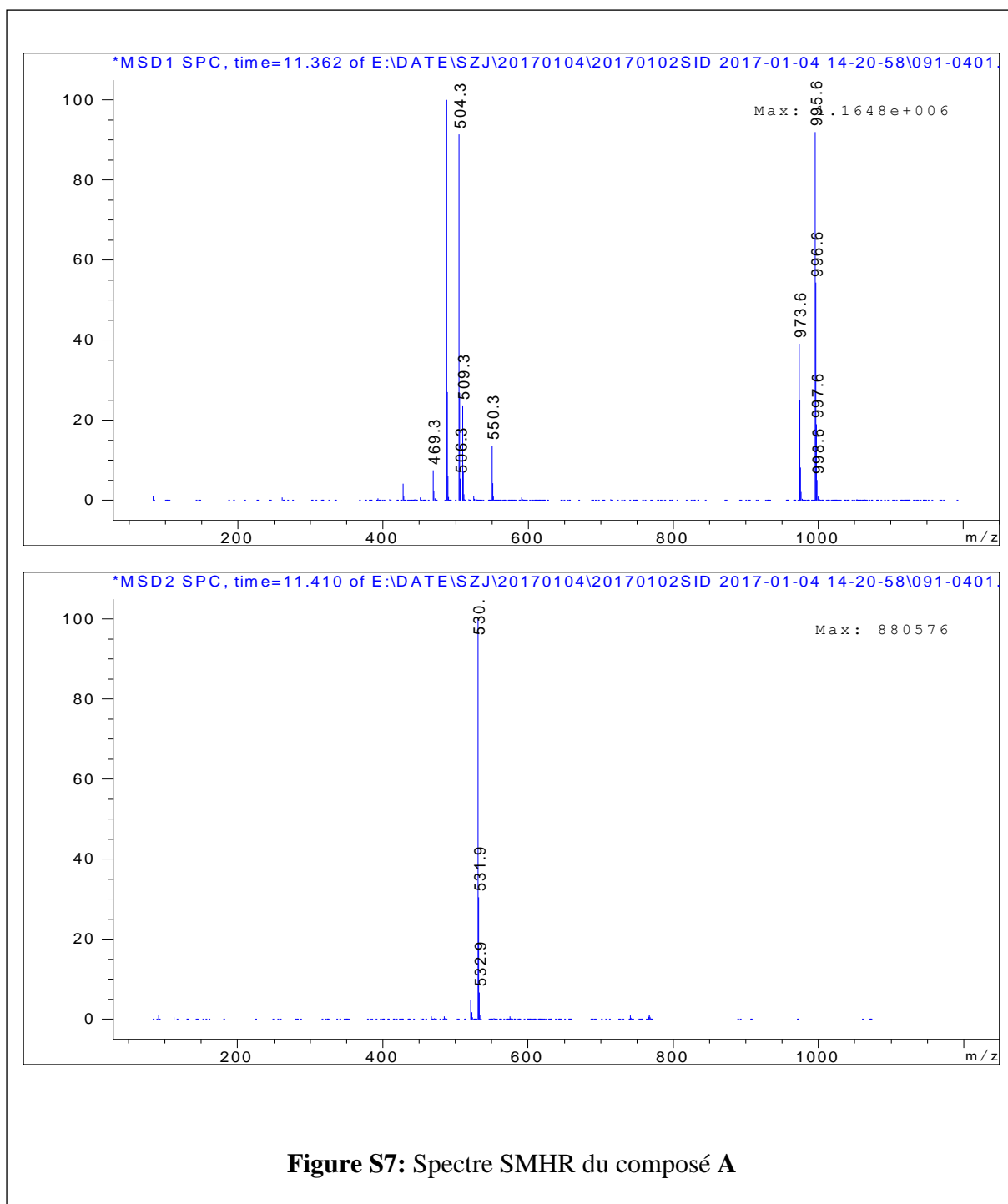


Figure S7: Spectre SMHR du composé A

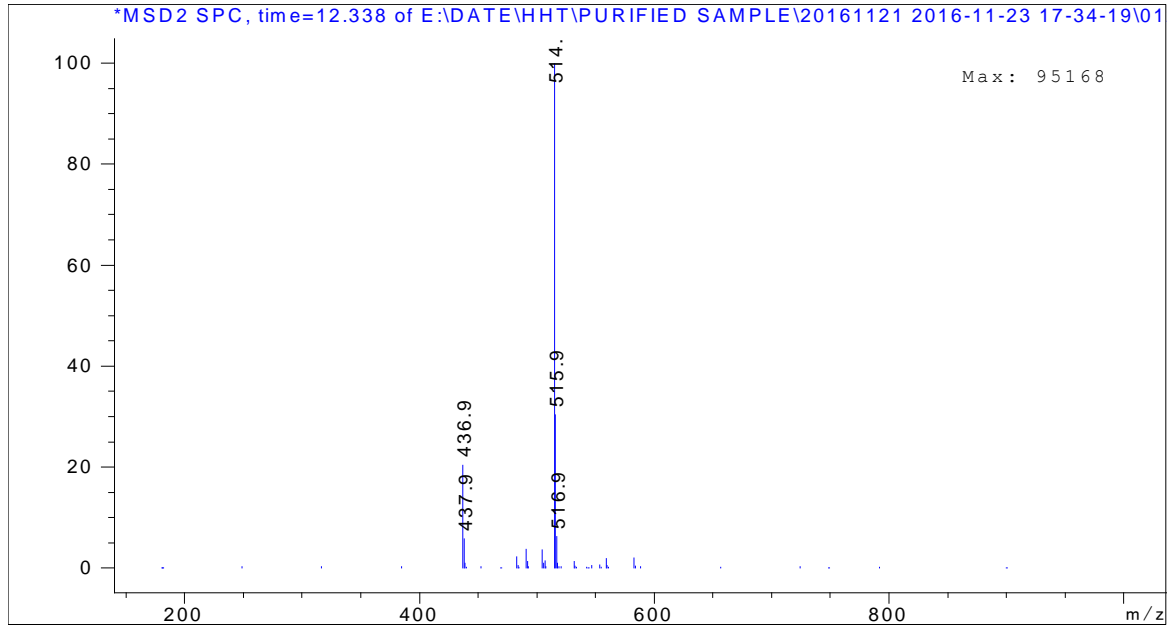
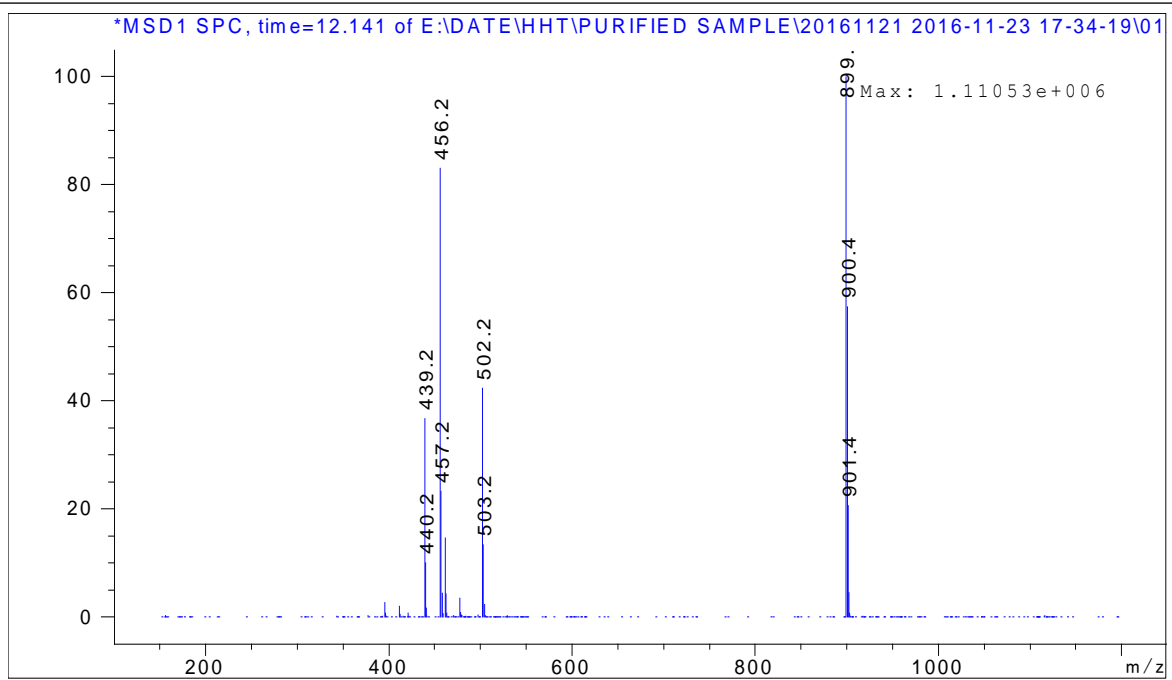


Figure S8: Spectre SMHR du composé B

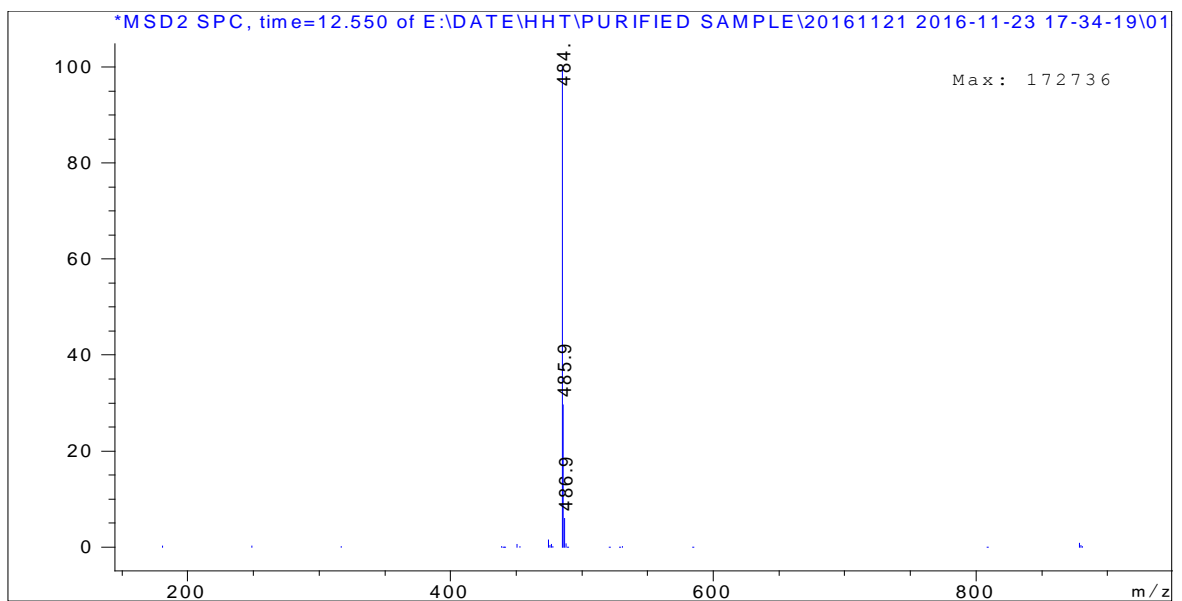
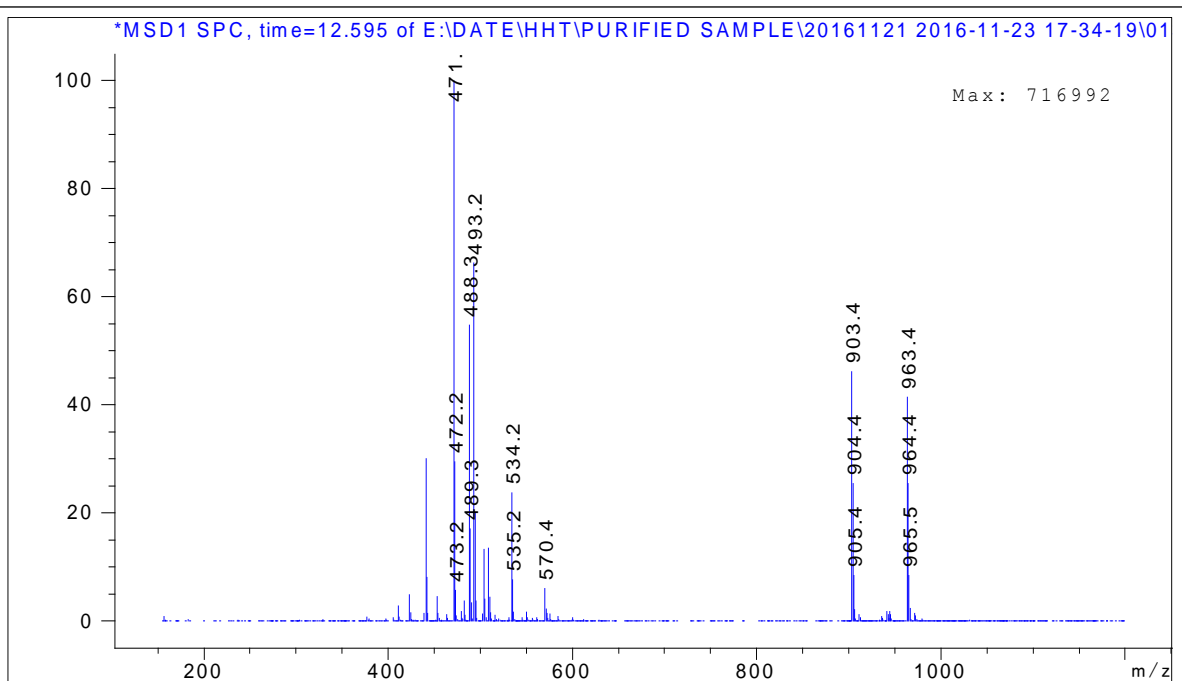


Figure S9: Spectre SMHR du composé C



PUBLICATION ISSUE DE LA THESE

1. Kouam AF, Yuan F, Njyou FN, He H, Tsayem RF, Oladejo BO, Song F, Moundipa PF and Gao GF (2017). Induction of Mkp-1 and Nuclear Translocation of Nrf2 by Limonoids from Khaya grandifoliola C.DC Protect L-02 Hepatocytes against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. Front. Pharmacol. 8:653. doi: 10.3389/fphar.2017.00653



Induction of Mkp-1 and Nuclear Translocation of Nrf2 by Limonoids from *Khaya grandifoliola* C.DC Protect L-02 Hepatocytes against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity

Arnaud F. Kouam^{1,2}, Fei Yuan², Frédéric N. Njyou¹, Hongtao He², Roméo F. Tsayem¹, Babayemi O. Oladejo², Fuhang Song², Paul F. Moundipa^{1*} and George F. Gao²

¹ Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon, ² CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

OPEN ACCESS

Edited by:

Banasri Hazra,
Jadavpur University, India

Reviewed by:

SubbaRao V. Madhunapantula,
Jagadguru Sri Shivarathreeswara
University, India
Germain Sotoing Taiwe,
University of Buea, Cameroon

*Correspondence:

Paul F. Moundipa
pmoundipa@hotmail.com;
pmoundipa@uy1.uninet.cm

Specialty section:

This article was submitted to
Ethnopharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 20 June 2017

Accepted: 01 September 2017

Published: 19 September 2017

Citation:

Kouam AF, Yuan F, Njyou FN,
He H, Tsayem RF, Oladejo BO,
Song F, Moundipa PF and Gao GF
(2017) Induction of Mkp-1
and Nuclear Translocation of Nrf2 by
Limonoids from *Khaya grandifoliola*
C.DC Protect L-02 Hepatocytes
against Acetaminophen-Induced
Hepatotoxicity.
Front. Pharmacol. 8:653.
doi: 10.3389/fphar.2017.00653

Drug-induced liver injury (DILI) is a major clinical problem where natural compounds hold promise for its abrogation. *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) is used in Cameroonian traditional medicine for the treatment of liver related diseases and has been studied for its hepatoprotective properties. Till date, reports showing the hepatoprotective molecular mechanism of the plant are lacking. The aim of this study was therefore to identify compounds from the plant bearing hepatoprotective activity and the related molecular mechanism by assessing their effects against acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicity in normal human liver L-02 cells line. The cells were exposed to APAP (10 mM) or co-treated with phytochemical compounds (40 μ M) over a period of 36 h and, biochemical and molecular parameters assessed. Three known limonoids namely 17-epi-methyl-6-hydroxylangolensate, 7-deacetoxy-7-oxogedunin and deacetoxy-7R-hydroxygedunin were identified. The results of cells viability and membrane integrity, reactive oxygen species generation and lipid membrane peroxidation assays, cellular glutathione content determination as well as expression of cytochrome P450 2E1 demonstrated the protective action of the limonoids. Immunoblotting analysis revealed that limonoids inhibited APAP-induced c-Jun N-terminal Kinase phosphorylation (p-JNK), mitochondrial translocation of p-JNK and Bcl₂-associated X Protein, and the release of Apoptosis-inducing Factor into the cytosol. Interestingly, limonoids increased the expression of Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase (Mkp)-1, an endogenous inhibitor of JNK phosphorylation and, induced the nuclear translocation of Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor-2 (Nrf2) and decreased the expression of Kelch-like ECH-associated Protein-1. The limonoids also reversed the APAP-induced decreased mRNA levels of Catalase, Superoxide Dismutase-1, Glutathione-S-Transferase and Methionine Adenosyltransferase-1A. The obtained results suggest that the isolated limonoids protect L-02 hepatocytes against APAP-induced hepatotoxicity mainly through increase expression of Mkp-1 and nuclear translocation of Nrf2.

Thus, these compounds are in part responsible of the hepatoprotective activity of *K. grandifoliola* and further analysis including *in vivo* and toxicological studies are needed to select the most potent compound that may be useful as therapeutic agents against DILI.

Keywords: *K. grandifoliola*, limonoids, acetaminophen, hepatoprotection, Mkp-1, Nrf2

INTRODUCTION

Liver is the main site of detoxification and as such, represents the primary target of drug exposure in the body (Kumari and Kakkar, 2012a). DILI is a major clinical problem and public concern worldwide (Jaeschke et al., 2014). It is the case of APAP (*N*-acetyl-para-amino-phenol), a commonly used analgesic and antipyretic drug that is safe at therapeutic dose; but can cause severe hepatotoxicity and even death at an overdose (Nourjah et al., 2006). APAP-hepatotoxicity cannot only bind to its biotransformation, essentially by the isoform 2E1 of cytochrome P450 enzymes to form a reactive metabolite; *N*-acetyl-para benzo-quinone imine (NAPQI), but also to the excessive generation of ROS. Overproductions of NAPQI and ROS cause a depletion of glutathione (GSH) as well as the inactivation of antioxidant enzymes, leading to oxidative stress (Jaeschke et al., 2014). Additionally, NAPQI and ROS if excessive can covalently bind and/or oxidize cellular macromolecules, causing hepatocytes death and liver injury (Xie et al., 2014). Furthermore, several studies have recently demonstrated that oxidant stress activates specific downstream biochemical signaling cascades, which perpetuate APAP-induced hepatotoxicity; including the c-Jun N-terminal kinase (JNK) family (Gunawan et al., 2006; Saito et al., 2010; Xie et al., 2014).

Junc N-terminal kinase proteins are members of the MAPK superfamily that regulate numerous cellular processes and diseases, including liver injury and hepatocytes death (Singh et al., 2009; Saito et al., 2010). Oxidant stress generated during APAP-hepatotoxicity leads to the JNK activation, likely by the upstream kinases, including apoptosis signal-regulating kinases (Nakagawa et al., 2008). Activated JNK amplifies hepatic damages by altering redox status, modulating Bcl-2 protein family activity, and inducing mitochondrial dysfunction (Bajt et al., 2006, 2008, 2011; Saito et al., 2010). Since oxidative stress and JNK activation are emerging as key mediators in APAP-induced liver injury, recent studies have examined up-regulation of antioxidative pathways and endogenous or exogenous JNK inhibitors for their potential therapeutic use (Saito et al., 2010; Wancket et al., 2012;

Pang et al., 2016). One such class of endogenous JNK inhibitors is the MAPK phosphatase-1 (Mkp-1) (Keyse, 2000; Wang and Liu, 2007) while the nuclear factor-erythroid 2(NF-E2) related factor-2 (Nrf2) signaling is an example of antioxidative pathways (Niture et al., 2010).

Mkp-1, also referred as DUSP-1 (dual specificity protein phosphatase-1) is the prototype of the Mkp family which preferentially inactivated the stress-induced by MAPK JNK proteins in mammalian cells (Hammer et al., 2006). Kamata et al. (2005) demonstrated that ROS promotes sustained JNK activation and cell death by inhibiting Mkp-1. Moreover, Mkp-1 deficiency enhances APAP hepatotoxicity by prolonging hepatic JNK activation (Wancket et al., 2012). These data provide indications that Mkp-1 maybe a novel endogenous hepatoprotective factor during hepatotoxicity.

Up-regulation of many antioxidant enzymes in the liver is mediated by Nrf2, a transcription factor which plays a pivotal role in the activation of antioxidant gene expression (Niture et al., 2010). Upon cell stimulation, Nrf2 dissociates from its suppressor, Keap-1 and translocates into the nucleus where it binds to the antioxidant response elements (ARE) and promotes the expression of its target genes such as superoxide dismutase (SOD), CAT and glutathione *S*-transferase (GST) (Jaiswal, 2004). It has been shown that Nrf2 protects liver against several xenobiotic through transcriptional up-regulation of antioxidant enzymes (Chen et al., 2013; Pang et al., 2016), suggesting that activation of Keap1-Nrf2 pathway may also be a novel strategy to prevent DILI.

Several herbal medicines and their active constituents have been shown to protect liver against the aforementioned pathological processes (Madrigal-Santillán et al., 2014). It is the case of *Khaya grandifoliola*, a plant belonging to the family of Meliaceae, widely distributed from western Africa to Guinean coast. In Cameroon, *K. grandifoliola* is used in traditional medicine for the treatment of jaundice and others related liver diseases (Moundipa et al., 2002). Ethnobotanical surveys conducted in Nigeria also reported that the plant is used in folk medicine for the treatment of malaria, anemia, arthritis, convulsion and fever (Odugbemi et al., 2007; Olowokudejo et al., 2008). Pharmacological studies on this plant have demonstrated anti-malarial (Makinde et al., 2006), antibacterial (Stephen et al., 2009), anti-anemic (Adeyemi and Gbilade, 2006), anti-inflammatory (Falodun et al., 2009) and antifungal (Onifade, 2006) activities. Phytochemical studies have led to the isolation and characterization of 11 limonoids including grandifotane A (Yuan et al., 2010), methylangolensate and gedunin which showed anti-plasmodial effects (Bickii et al., 2000; Makinde et al., 2006). In addition, its hepatoprotective properties have been demonstrated and, a fraction with highly promising activity has

Abbreviations: AIF, apoptosis-inducing factor; ALT, alanine aminotransferase; APAP, acetaminophen; Bax, Bcl₂-associated X protein; CAT, Catalase; CYP2E1, cytochrome P450 2E1; DILI, drug-induced liver injury; GSH, reduced glutathione; GST, glutathione-*S*-transferase; H₂DCFDA, 2',7'-Dichloro-dihydrofluorescein diacetate; HPLC, high performance liquid chromatography; HRMS, high resolution mass spectrometry; JNK, c-Jun N-terminal Kinase; Keap-1, Kelch-like ECH-associated protein-1; KgF25, methylene chloride/methanol (75:25, v/v) fraction of *K. grandifoliola*; KgF25sf, sub-fraction of KgF25; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MAT1A, methionine adenosyltransferase-1A; Mkp-1, mitogen-activated protein kinase phosphatase-1; NAPQI, *N*-acetyl-para benzo-quinone imine; NMR, nuclear magnetic resonance; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; p-JNK: Phospho-JNK; ROS, reactive oxygen species; SOD1, superoxide dismutase-1; SP, JNK inhibitor SP600125.

been isolated (Njayou et al., 2013, 2015, 2016). However, there are no available reports showing the hepatoprotective molecular mechanism of its active ingredients. Taking into account the complex pathophysiology of APAP-induced hepatotoxicity, this study was designed to investigate the protective mechanism of active compounds isolated from *K. grandifoliola* in APAP-induced oxidative damage in L-02 cell, a hepatocyte cell line, by assessing their effect on the expression of some proteins involved in APAP-cell death mechanism and cellular antioxidant defense system.

MATERIALS AND METHODS

Chemical Compounds and Reagents

Acetaminophen was purchased from MedChem Express (Monmouth Junction, NJ 08852, United States); Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, α -Keto-glutaric Acid, L-Alanine, Thiobarbituric Acid, Trichloroacetic Acid, 2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA), silymarin, JNK inhibitor SP600125, MITOISO2 – Mitochondria Isolation Kit were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, United States); M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent, NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Proteins Extraction Kit, Halt protease inhibitor cocktail EDTA-Free 100X, Pierce bicinchoninic acid (BCA) Proteins Assay Kit, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate were all purchased from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, United States). Rabbit polyclonal anti-CYP2E1 antibody (1:1500 dilution) was purchased from Sino Biological Inc. (Beijing, China); Rabbit polyclonal anti-phospho-JNK1/JNK2 and JNK2 antibodies (1:1000 dilution) were purchased from Signalway Antibody (Baltimore, MD, United States); Rabbit polyclonal anti-MKP-1, Nrf2, Keap-1, AIF, COX IV, Lamin B and mouse polyclonal anti-Bax antibodies (all 1:1000 dilution) were purchased from Beijing Biosynthesis Biotechnology CO., LTD. (Beijing, China); Mouse monoclonal anti- β -actin primary antibody (1:5000 dilution), horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse IgG AP-linked secondary antibodies (1:2000 dilution) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, United States); TRIzol® Reagent was purchased from Ambion Life Technologies (Carlsbad, CA, United States); First-Strand cDNA Synthesis Kit was purchased from Promega (Madison, WI, United States); iTaq Universal SYBR Green Supermix Kit was purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, United States); All primers of the genes of interest were synthesized by TSINGKE Biological Technology Company (Beijing, China). All others reagent used in this study were of analytical grade.

Preparation of Plant Crude Extracts, Fractions and Sub-Fractions

Stem barks of *K. grandifoliola* were collected in June 2015 in Fouban (West Cameroon). The botanical identification of the plant was done at the Cameroon National Herbarium, where voucher specimen is kept under the reference number 23434 YA. *K. grandifoliola* most active fraction, namely KgF25 (methylene chloride/methanol 75:25, v/v) was prepared as

previously described (Njayou et al., 2015, 2016). Therefore, 8 g of KgF25 were subjected to silica gel 60 (particle size 40–63 μ m) column chromatography (column: d \times h = 3.5 cm \times 65 cm) and gradient of hexane/acetyl acetate (100:0 v/v to 0:100 v/v), then acetyl acetate/methanol (10:90 v/v to 0:100 v/v) were used for elution. The 47 chromatographic fractions containing crystalline solid obtained were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and pooled into 5 sub-fractions namely KgF25sf1 (41 mg); KgF25sf2 (67 mg); KgF25sf3 (19 mg); KgF25sf4 (105 mg); and KgF25sf5 (55 mg) based on the similarity of their TLC profiles.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis and Purification

Following the preliminary results, the most active sub-fractions were analyzed by HPLC-ACN (Acetonitrile)-Standard-Method and compounds were purified by HPLC-ACN-Standard-Purify-Method. We used a Series 1200 Liquid Chromatograph (Agilent Technologies, Folsom, CA, United States) equipped with a vacuum degasser, a quaternary pump, an autosampler and a Diode-Array-Detector (DAD) connected to Agilent ChemStation software. An Eclipse XDB-C8 column (9.4 mm \times 250 mm, 5 μ m particle size) was used. The mobile phase was (A) water; (B) acetonitrile. The flow rate was 1 mL/min. The elution conditions were: B, 0–15 min, increasing gradient from 0 to 30% B; 15–20 min, linear gradient 100% B; 20–25 min, linear gradient 30% B. The system operated at 28°C and the injection volume of each sample dilute in methanol (1 mg/mL) was 5 μ L. The detection wavelength was kept at 254 nm.

Spectral Analysis of Purified Compounds

High-Resolution Mass Spectra (HRMS) of each pure sample dissolved in methanol was measured on an Agilent 1200 HPLC/6520 High-resolution mass spectrometer. NMR of each pure sample dissolved in DMSO (5 mg/mL) was recorded on BRUKER AV 500 spectrometer.

Cell and Culture Conditions

The normal human liver cell line L-02, (Cell Bank, Type Culture Collection of Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China) derived from an adult human normal liver were used. Cells were cultured in 100 mm dish and maintained in high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum, L-glutamine (2 mM), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 μ g/mL) and amphotericin B (0.25 μ g/mL) in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

Cells Treatment: General Procedure

In this study, silymarin and JNK-inhibitor SP600125 were used as reference compounds. APAP, silymarin, sub-fractions of KgF25 and isolated compounds were diluted in 20% DMSO [20% DMSO in phosphate-buffer saline (PBS)]. JNK-inhibitor SP600125 was dissolved in 100% DMSO. L-02 cells (approximately 2.10⁵ cells/ml) in triplicate were seeded into 24-well plate labeled as control, APAP, standard and test (references

or plant sample + APAP) and incubated for 24 h. Thereafter, the medium was replaced with fresh medium and cells were incubated in absence (control group) or in presence of APAP (APAP group), or in presence of APAP and references or plant sample (test groups) for different time points (6; 12; 24; and 36 h) depending on the downstream analysis.

Determination of the Toxic Concentration of APAP to Be Used

Cells were incubated in presence of APAP at the final concentrations of 0; 5; 10; 15; 20; and 30 mM. After 36 h, cell viability was measured using 3-(4, 5-dimethylthiosol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide kit (MTT; Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions and the cell membrane integrity was assessed by measuring ALT activity released into the incubation medium using a calibration curve according to Reitman and Frankel (1957). Cell viability was expressed as percentage of the control and the half lethal concentration (LC₅₀) of APAP was determined and used as toxic concentration for the following experiments.

Hepatoprotective Activity Screening of Plant Sub-Fractions and Dose-Response Study of the Selected Active Sub-Fractions and Isolated Compounds

Cells were treated simultaneously with APAP (LC₅₀) and plant sub-fractions or silymarin at the final concentration of 100 µg/mL for the hepatoprotective activity screening. After 36 h, cell viability and cell membrane integrity were assessed as abovementioned. Selected active sub-fractions and silymarin were tested at the final concentration of 25; 50; and 100 µg/mL for the dose-response study. Isolated compounds were then tested at 0; 10; 20; 30; and 40 µM and JNK inhibitor SP600125 at the final concentration of 0; 5; 10; 15; and 20 µM in order to minimize the effect of DMSO in APAP metabolism. After end time point, cell viability and membrane integrity were assessed and the half efficient concentrations (EC₅₀) determined.

Propidium Iodide (PI) Staining

Cells were simultaneously treated with APAP and isolated compounds or JNK inhibitor at the determined concentration. After 36 h, cells were washed with cold PBS and stained with 10 µg/mL of PI solution for 5 min. Cells were then stained with 1 µg/mL of 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) solution for 25 min and image were recorded with a fluorescence microscope (Advanced Microscopy Group).

Measurement of Intracellular ROS Level and Lipid Membrane Peroxidation

Intracellular ROS were measured according to reported method (Ji et al., 2009). Briefly, cells were treated with 20 µM H₂DCFDA, APAP (10 mM) and isolated compounds or JNK inhibitor at the determined concentrations for 36 h. After treatment, supernatant was collected and cells were washed with PBS, immediately lysed in an appropriate lysis buffer, the whole cell

lysates were centrifuged (10,000 g, 5 min, 4°C) and aliquot of lysate was used for fluorescence measurement at excitation 485 ± 20 nm, emission 525 ± 20 nm in a black wall with clear bottom 96-well plate using a spectrophotometer (SpectraMax M5, Molecular Devices) and presented as percentage of control. Lipid membrane peroxidation was evaluated through the malondialdehyde (MDA) level in the cellular supernatant by the thiobarbituric acid (TBA) method by using its molar extinction coefficient ($\epsilon_{\text{MDA}} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) as described by Buege and Aust (1978).

Measurement of Cellular GSH Content

After treating cells with APAP and isolated compounds or JNK inhibitor for the indicated time, cells were harvested and lysed in lysis buffer. The whole cell lysates were centrifuged (10,000 g, 5 min, 4°C). The supernatant was collected and the GSH concentration was determined by using its molar extinction coefficient ($\epsilon_{\text{GSH}} = 13,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) by the 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) assay as described by Ellman (1959).

Protein Extraction and Subcellular Fractionation

Cells were simultaneously treated with APAP and plant sub-fractions, silymarin, isolated compounds or JNK inhibitor at the determined concentration and incubated for different time points. Afterward, total proteins were extracted using M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific) containing 0.2% Halt protease inhibitor cocktail EDTA-Free 100X (Thermo Scientific); cytosolic and nuclear protein were extracted using NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Proteins Extraction Kit (Thermo Scientific); mitochondrial and cytosolic fractions were prepared with MITOISO2 - Mitochondria Isolation Kit (Sigma-Aldrich); protein concentration in each sample was quantified with Pierce BCA Proteins Assay Kit (Thermo Scientific). All procedures were performed according to each manufacturer's instructions.

Western Blot Analysis

Equal amount of protein in Laemmli loading buffer (10 µl containing ≈ 50 µg of protein) was separated by 12 % Sodium-Dodecyl-Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and electro-transferred into a Nitrocellulose Blotting Membrane (GE Healthcare, Life Science, Germany). The membrane were blocked with 5% w/v dehydrated skimmed milk in Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST: 10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0.05% tween-20; pH 7.6); incubated overnight at 4°C with primary antibodies, rinsed, and then incubated 1 h at 25°C with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Membrane was stained SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, United States) and detection was performed by Enhanced Chemiluminescent Method which combines MicroChemi Unit and GelCapture Software. Densitometry analysis of the protein bands was performed using ImageJ Software.

RNA Isolation and cDNA Synthesis

L-02 cells were simultaneously treated with APAP and isolated compounds or JNK inhibitor and incubated for the indicated time. After treatment, Total RNA was extracted from cells using TRIzol® Reagent (Ambion, Life Technologies) according to the manufacturer's instruction. RNA concentration and purity were determined by reading the absorbance at 230; 260; and 280 nm by using a ND-2000 NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific). The 260/280 ratio of our RNA preparation ranged from 1.8 to 2.1 while the 260/230 ratio were greater than 2. These values indicate good RNA quality and therefore could be used for reverse transcription. First-strand synthesis cDNA was synthesized in the thermo cycler (Eastwin, Life Science) using Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT, Promega, Woods Hollow Road Madison, United States) as directed by the manufacturer.

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) Analysis

Real-time qPCR was performed in Applied Biosystems 7500 System using iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA, United States) according to the manufacturer's instruction. Relative expression of target genes was normalized to the endogenous gene (GAPDH) used as internal control, analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method using GenEX Software and given as ratio compared to the control group. All primers of interest genes were synthesized by TSINGKE Biological Technology Company (Beijing, China). Their sequences are presented in the Table 1.

Statistical Analysis

Results are presented as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments in triplicate. Comparisons between the mean values of various treatments groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's *post hoc* test whenever significant differences were observed between the variances. Comparisons were made between untreated group (DMSO control group) and intoxicated group (APAP-intoxicated group), and between APAP-intoxicated group and treated groups (APAP + tested or

reference compounds). Differences between compared groups were considered significant for $p < 0.05$. Analyses were performed using Prism 5.03 statistical software (Graph Pad Inc.).

RESULTS

HPLC Fingerprint of Selected Active Sub-Fractions and Spectral Analysis of Purified Compounds

High Performance Liquid Chromatography chromatogram of KgF25sf1 (Supplementary Figure S1A) showed several peaks with different retention time. The higher peak (retention time: 11.22 min) was designated as compound A (C-A). HPLC chromatogram of KgF25sf2 (Supplementary Figure S1B) showed two main peaks with the retention time at 12.05 and 12.33 min and were designated as compound B (C-B) and (compound C) (C-C) respectively. C-A, C-B and C-C were purified and characterized. Comparison of their HRMS and NMR spectral data (Supplementary Figures S2–S10) with data literature (Atta-ur-Rahman et al., 2008; Tanaka et al., 2011, 2012) allowed for the unambiguously identification of three known limonoids (Figure 1) as 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate, 7-deacetoxy-7-oxogedunin and 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin, respectively, for C-A, C-B and C-C.

APAP-Induced Cell Death and Loss of Membrane Integrity in L-02 Hepatocytes

As a normal hepatic cell line, L-02 cells are commonly used in hepatotoxicity studies induced by various xenobiotic (Xiao et al., 2014; Pang et al., 2016). Extra cellular level of ALT activity, a cytosolic enzyme is routinely used to evaluate the membrane integrity during APAP toxicity study *in vitro* (Xie et al., 2014). We evaluated the toxicity of APAP in L-02 cells by performing a dose-dependent study with APAP concentration range from 5 to 30 mM. Exposure of L-02 hepatocytes to APAP for 36 h dose-dependently resulted in significant ($p < 0.05$) loss of cell viability (Figure 2A) and increase cellular ALT leakage into the incubation medium (Figure 2B). The LC₅₀ was found to be 9.80 ± 2.61 mM, and therefore, 10 mM of APAP was chosen as toxic concentration for the following experiment in this work.

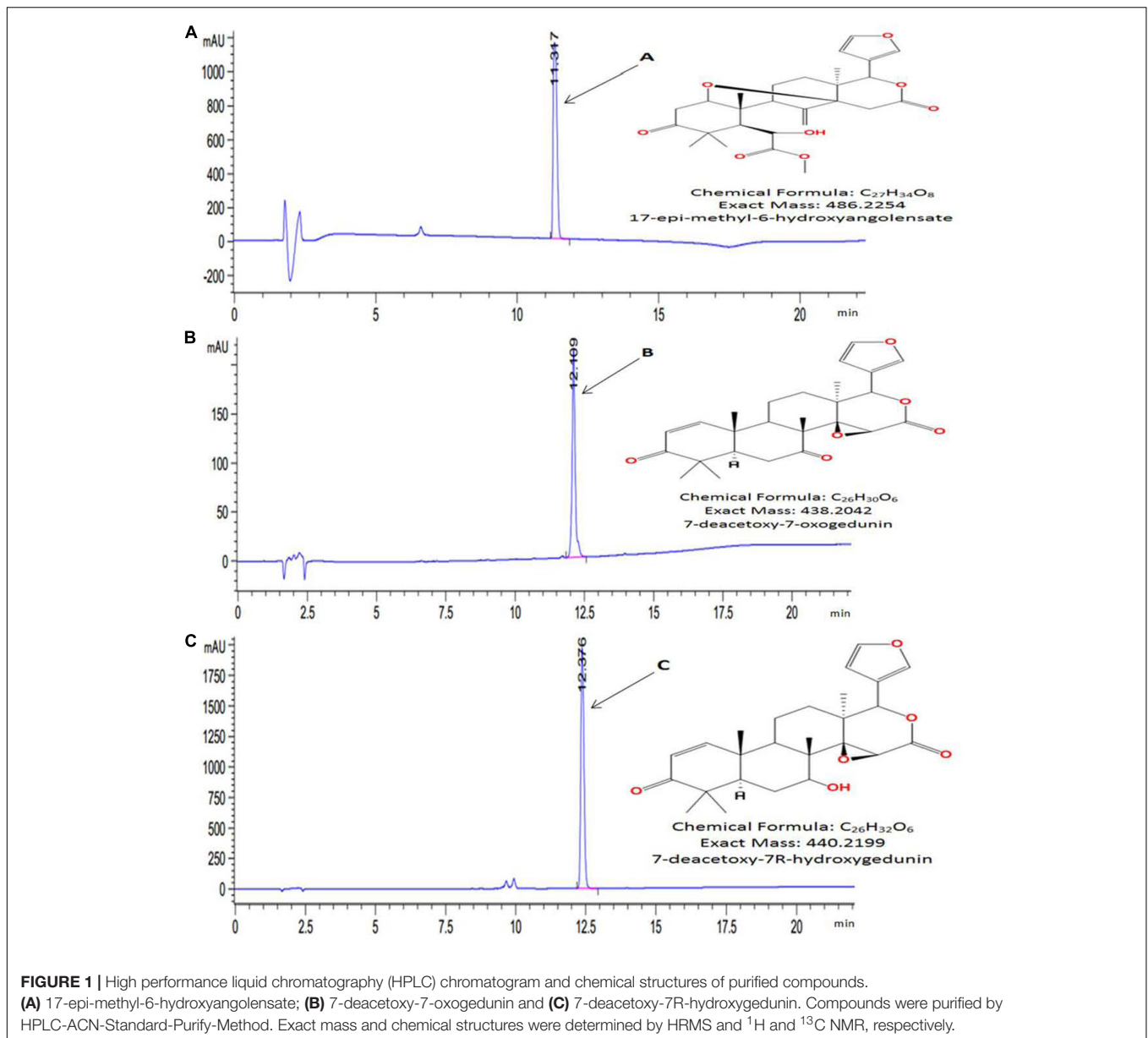
Hepatoprotective Activity Screening of KgF25 Sub-Fractions

The sub-fractions were tested against APAP-induced hepatotoxicity. As presented in Figures 3A,B, respectively, sub-fractions KgF25sf1, KgF25sf2, and KgF25sf3 significantly ($p < 0.05$) maintained cell viability and inhibited the release of ALT from the cell. These activities were not statistically different from that of silymarin, a well-known hepatoprotective flavonoids mixture. The above sub-fractions, being the most active, have been selected for the next part of the study.

TABLE 1 | Primer sequences used for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Genes	Primer Sequence (5' ____ 3')	
	Forward	Reverse
CAT	AGGCCAGTCCTGACAAAATG	GAATCTCCGCACTTCTCCAG
SOD1	GAAGGTGTGGGAAGCATT	ACATTGCCCAAGTCTCCAAC
GST	TTGGCCTCCTGTATTCCTTG	AGCCAAGTGGATGCTGAGTT
MAT1A	TAGGGACTGACCAGCAGCTT	AGGGACCAGGGAAAGAGAAA
GAPDH	CGACCACTTTGTCAAGCTCA	AGGGGTCTACATGGCAACTG

CAT, catalase; SOD1, superoxide dismutase1; GST, glutathione-S-Transferase; MAT1A, methionine adenosyltransferase 1A; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



Dose-Dependent Protective Effect of Active Sub-Fractions and Isolated Limonoids against APAP-Induced Toxicity

Incubation of cells with APAP (10 mM) for 36 h resulted in a significant ($p < 0.05$) decrease of cell viability (**Figure 4A**) and increase of ALT (**Figure 4B**) activity leakage into the incubation medium. When hepatocytes were co-treated with active sub-fractions or silymarin at various concentrations (25; 50; and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a concentration-dependent protective and inhibitory effects on cell viability (**Figure 4A**) and ALT leakage (**Figure 4B**) was observed. Likewise, a similar effect on these parameters (**Figures 4C,D**) was observed when cells were co-treated with isolated limonoids (10; 20; 30; and 40 μM) or

JNK inhibitor SP600125 (5; 10; 15; and 20 μM). The EC_{50} were $19.04 \pm 3.42 \mu\text{M}$, $20.89 \pm 3.68 \mu\text{M}$, $17.40 \pm 2.79 \mu\text{M}$, and $13.76 \pm 2.37 \mu\text{M}$, respectively, for compound A (17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate), compound B (7-deacetoxy-7-oxogedunin), compound C (7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin) and JNK inhibitor SP600125. Although the EC_{50} of JNK inhibitor was lower than those of isolated limonoids, JNK inhibitor offered only partial protection (cell viability = $85.66 \pm 3.51\%$) while limonoids from *K. grandifoliola* showed almost total protection when added at 40 μM (cell viability $\geq 95\%$) as confirmed by PI cell death staining (**Figure 5**). When active sub-fractions or isolated compounds were added at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or 40 μM , the viability of hepatocytes were not statistically different from those of control group and the levels of extracellular ALT activity were lower. Based on this

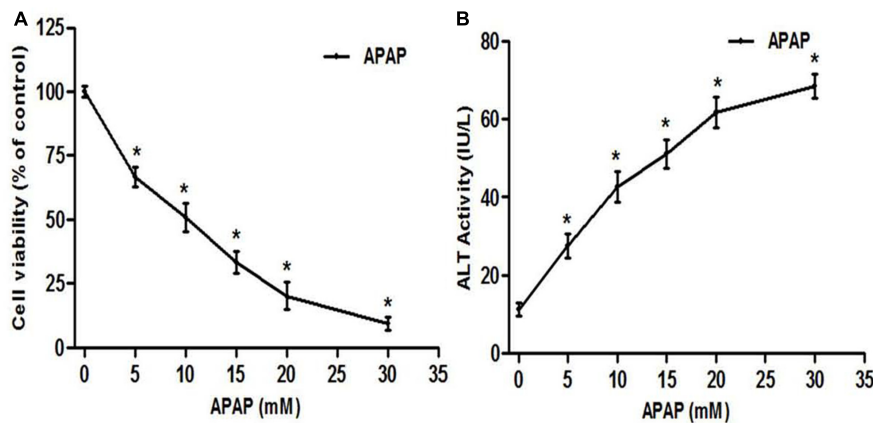


FIGURE 2 | Acetaminophen (APAP) induced cell death and loss of membrane integrity in L-02 hepatocytes. Cells were treated with various concentration of APAP (5–30 mM) for 36 h. **(A)** Cell viability indicating dose-response of APAP toxicity; **(B)** loss of membrane integrity indicated by ALT activity found in the culture medium. Values are means \pm SD of three independent experiments in triplicate. ANOVA analysis: $F(5,30) = 377.7$, $P < 0.0001$ **(A)** and $F(5,30) = 251.7$, $P < 0.0001$ **(B)**. *Values significantly different compared to control (0 mM) ($P < 0.05$) using Bonferroni's test.

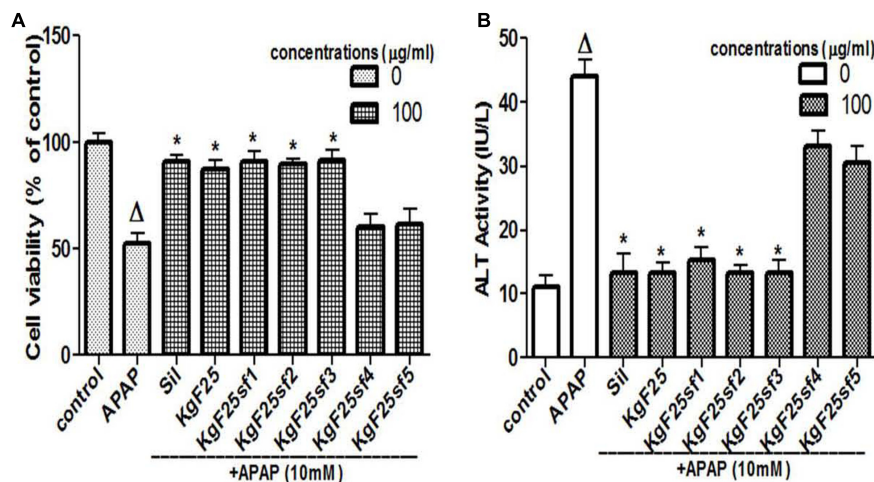


FIGURE 3 | Hepatoprotective screening activity of plants sub-fractions. L-02 cells were treated without or with APAP, or co-treated with APAP and KgF25 sub-fractions or silymarin for 36 h. After treatment, cell viability **(A)** and ALT activity **(B)** leakage into the incubation were determined. Values are means \pm SD of three independent experiments in triplicate. ANOVA analysis: $F(8,45) = 76.47$, $P < 0.0001$ **(A)** and $F(8,45) = 180.3$, $P < 0.0001$ **(B)**. Δ Values significantly different compared to control group ($P < 0.05$); *values significantly different compared to APAP intoxicated group ($P < 0.05$) using Bonferroni's test. Sil: silymarin; KgF25: methylene chloride/methanol (75:25, v/v) fraction of *K. grandifoliola*; KgF25sf1: sub-fraction 1 of KgF25; KgF25sf2: sub-fraction 2 of KgF25; KgF25sf3: sub-fraction 3 of KgF25; KgF25sf4: sub-fraction 4; of KgF25, KgF25sf5: sub-fraction 5 of KgF25.

observation, these concentrations were chosen for the following experiments.

Isolated Compounds Attenuated and Rescued APAP-Induced GSH Depletion, via Inhibition of Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) Expression

Acetaminophen hepatotoxicity is initiated by its biotransformation by CYP2E1 to the electrophile NAPQI, and overexpression of CYP2E1 plays a critical role in this process (Jaeschke et al., 2002). To evaluate whether the protective effect

of active sub-fractions and isolated compounds was related to the expression of CYP2E1, the protein expression of CYP2E1 was determined by western blot analysis after co-treatment of cells with APAP (10 mM) and active sub-fractions (100 μ g/mL) or isolated compounds (40 μ M). The constitutive up-regulation of CYP2E1 expression by APAP treatment was significantly ($p < 0.05$) down-regulated when cells were co-treated with active sub-fractions (Figures 6A,B) or isolated compounds (Figures 6C,D). This effect was comparable to that observed in silymarin (100 μ g/mL) treated cells (Figure 6A). NAPQI, the reactive metabolite of APAP can react with the sulfhydryl group of cysteine in GSH, leading to its depletion and therefore

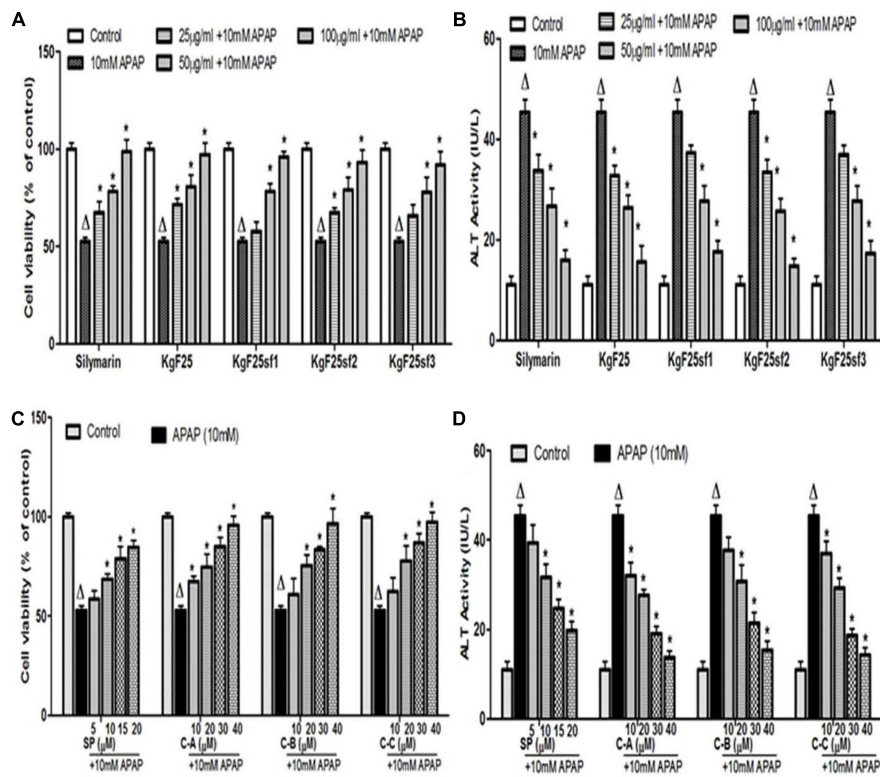


FIGURE 4 | Dose-dependent protective effect of active sub-fractions and isolated limonoids. Cells were treated without or with APAP (10 mM), or co-treated with APAP (10 mM) and active sub-fractions or silymarin (25; 50; and 100 µg/mL), isolated limonoids (10; 20; 30; and 40 µM) or JNK inhibitor (5; 10; 15; and 20 µM) for 36 h. **(A,B)** Effect of active sub-fractions on cell viability and ALT leakage, respectively. **(C,D)** Effect of isolated limonoids on cell viability and ALT leakage, respectively. Values are means \pm SD of three independent experiments in triplicate. ANOVA analysis: $F(6,14) = 33.82$, $P < 0.0001$ **(A)**; $F(6,14) = 77.74$, $P < 0.0001$ **(B)**; $F(5,12) = 48.96$, $P < 0.0001$ **(C)**; and $F(5,12) = 128.3$, $P < 0.0001$ **(D)**. Δ Values significantly different compared to control group ($P < 0.05$); * values significantly different compared to APAP intoxicated group ($P < 0.05$) using Bonferroni's test. KgF25: methylene chloride/methanol (75:25, v/v) fraction of *K. grandifoliola*; KgF25sf1: sub-fraction 1 of KgF25; KgF25sf2: sub-fraction 2 of KgF25; KgF25sf3: sub-fraction 3 of KgF25; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin; SP: JNK inhibitor SP600125.

enhance cellular oxidative stress (Jaeschke et al., 2012). As shown in **Figure 6E**, exposure to 10 mM APAP significantly ($p < 0.05$) reduced cellular GSH levels within 6 h, followed by further depletion during the next 30 h. Co-treatment of L-02 cells with isolated limonoids significantly ($p < 0.05$) attenuated GSH depletion after 6 h, followed by progressive restoration during the next 30 h. After 36 h, cellular GSH levels in co-treated cells were comparable to that of normal untreated cells.

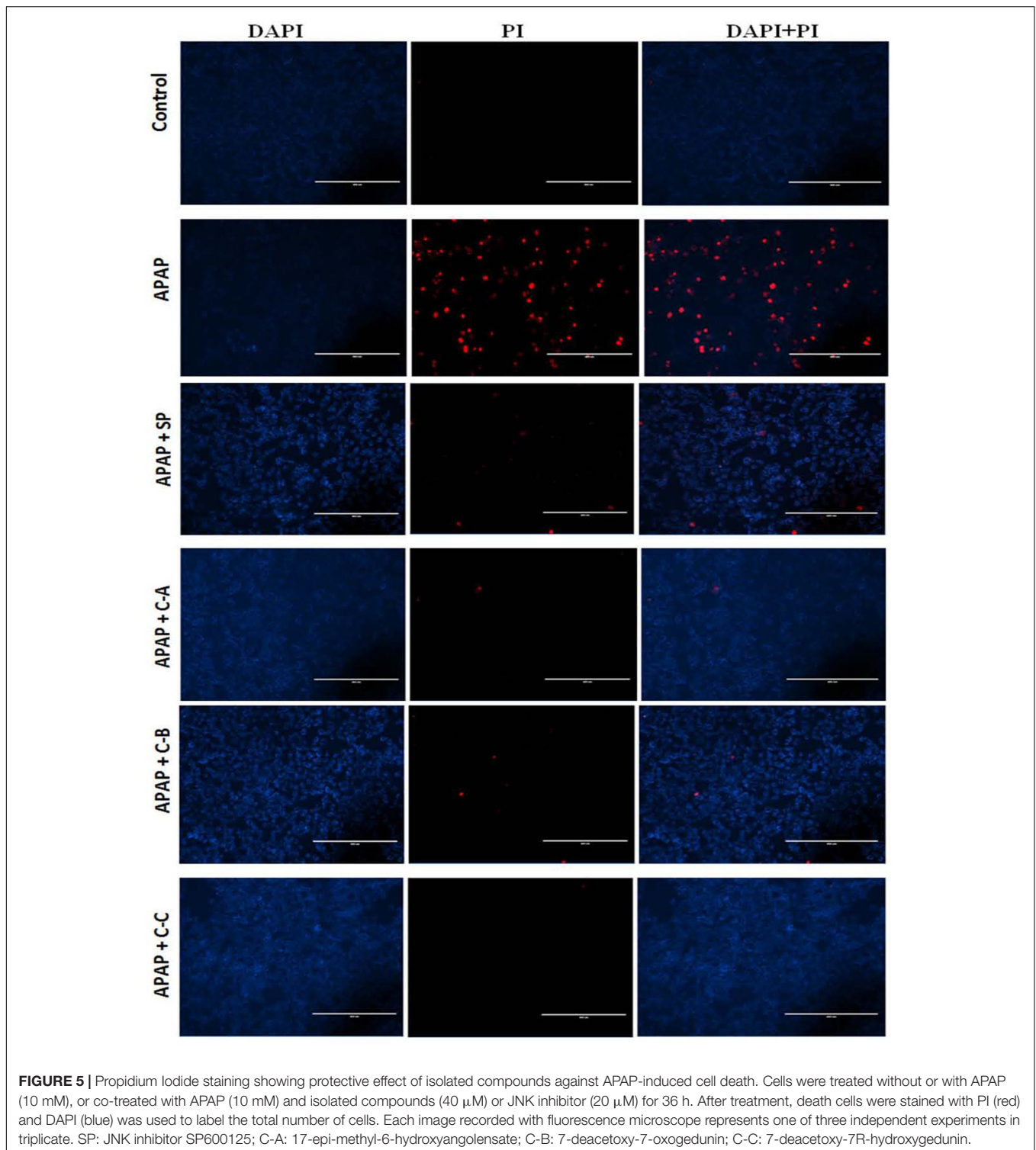
Isolated Limonoids Attenuated APAP-Induced ROS Generation and Lipid Peroxidation

Increase production of intracellular ROS occurring after GSH depletion plays an important role in APAP-induced injury (Jaeschke et al., 2002). **Figure 7A** depicts the effect of APAP-induced intracellular ROS generation in L-02 cells and its significant annihilation by co-treatment with isolated limonoids from *K. grandifoliola*. Hepatocytes stressed with APAP showed significant ($p < 0.05$) increase in ROS generation as compared to untreated cells. Co-treatment with isolated compounds (40 µM)

or JNK inhibitor (20 µM) significantly ($p < 0.05$) decreased ROS level as compared to APAP-treated cells. Overproduction of ROS initiates the process of lipid peroxidation in cell membranes and causes the destruction of cellular integrity as well as cell death (Kumari and Kakkar, 2012b). Lipid peroxidation was measured by estimating the concentration of MDA, an end product of lipid peroxidation into the incubation medium. As presented in **Figure 7B**, oxidative stress induced by free radical due to APAP in the hepatocytes caused a significant ($p < 0.05$) increase of MDA production. However, the MDA formation was significantly attenuated when cells were co-treated with isolated limonoids (40 µM) or JNK inhibitor (20 µM).

Active Sub-Fractions and Isolated Compounds Prevented APAP-Induced JNK Activation and Mitochondrial Translocation of p-JNK in L-02 Hepatocytes

Recently, JNK activation and the mitochondrial translocation of p-JNK have been well established to play a major role in



APAP-induced hepatotoxicity (Gunawan et al., 2006; Hanawa et al., 2008; Xie et al., 2014). To explore the effects of isolated compounds on JNK mediating cell death, total proteins were initially extracted 6 h after treating L-02 cells with 10 mM APAP or co-treated with APAP and active sub-fractions (100 μ g/mL) or

limonoids (40 μ M). The lysates were probed for JNK2 and p-JNK by western blotting. Administration of APAP alone resulted in massive p-JNK while co-treatment with active sub-fractions (Figure 8A) or isolated compounds (Figure 8B) significantly ($p < 0.05$) inhibited JNK activation.

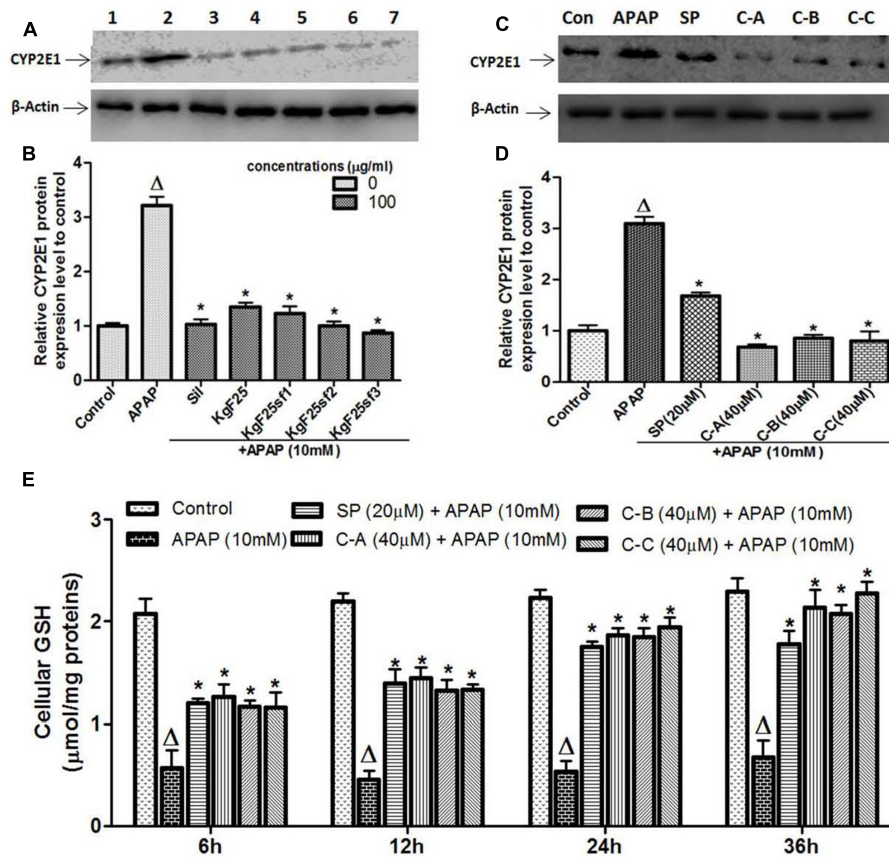


FIGURE 6 | Active sub-fractions and isolated limonoids down-regulated CYP2E1 proteins expression and rescued APAP-induced GSH depletion. Cells were treated without or with APAP (10 mM), or co-treated with APAP (10 mM) and active sub-fractions or silymarin (100 μg/mL), isolated compounds (40 μM) or JNK inhibitor (20 μM) for 6 h. After treatment, total proteins were extracted from cells and CYP2E1 expression was determined by western blotting. β-actin was used as loading control. Each blot represents one of three independent experiments. **(A,C)** Effect of active sub-fractions and isolated compounds on CYP2E1 expression, respectively. **(B,D)** Densitometry analysis of blots, respectively, for active sub-fractions and isolated compounds. **(E)** Effect of isolated compounds on cellular GSH. L-02 cells were treated without or with APAP (10 mM), or co-treated with APAP (10 mM) and isolated compounds (40 μM) or JNK inhibitor (20 μM) for 6, 12, 24, and 36 h. After each time point, total proteins were extracted and GSH contents were quantified. Values are means ± SD of three independent experiments in triplicate. ANOVA analysis: $F(6,14) = 200.9$, $P < 0.0001$ **(B)**; $F(5,12) = 219.6$, $P < 0.0001$ **(D)**; and $F(5,12) = 59.88$, $P < 0.0001$ **(E)**. ^ΔValues significantly different compared to control group ($P < 0.05$); *values significantly different compared to APAP intoxicated group ($P < 0.05$) using Bonferroni's test. Lane1: control; Lane2: APAP; Lane3: silymarin+APAP; Lane4: KgF25+APAP; Lane5: KgF25sf1+APAP; Lane6: KgF25sf2+APAP; Lane7: KgF25sf3+APAP. Sil: silymarin; KgF25: methylene chloride/methanol (75:25, v/v) fraction of *K. grandifoliola*; KgF25sf1: sub-fraction 1 of KgF25; KgF25sf2: sub-fraction 2 of KgF25; KgF25sf3: sub-fraction 3 of KgF25; SP: JNK inhibitor SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

Activated JNK translocate into mitochondria, leading to mitochondrial dysfunction and oxidant stress (Jaeschke et al., 2012). To determine whether isolated limonoids affect p-JNK translocation into mitochondria, cytosolic and mitochondrial fractions were prepared from L-02 cells and JNK activation was evaluated at 6 and 12 h after treatment. Similar to what was observed in total cell lysates, 10 mM APAP exposure caused JNK activation in the cytosol at 6 and 12 h (**Figures 9A,B**). We observed in the mitochondria of APAP treated cells a modest, but significant ($p < 0.05$) increase in p-JNK 6 h after APAP exposure (**Figure 9A**) and massive p-JNK at 12 h (**Figure 9B**). Co-treatment with isolated compounds prevented JNK activation in the cytosol at 6 and 12 h and its translocation into mitochondria (**Figures 9A,B**). These effects were comparable to those observed in JNK inhibitor treated cells.

Limonoids from *K. grandifoliola* Prevented Mitochondrial Bax Translocation and Release of AIF from Mitochondria to the Cytosol

Amplification of the mitochondrial oxidant stress by the translocation of p-JNK triggers the opening of the MPT pore in the mitochondria, followed by the mitochondrial Bax (Bcl₂-associated X protein) translocation. These effects are responsible for the translocation of mitochondrial intermembrane proteins such as AIF and endonuclease G to the nucleus as main cause of nuclear DNA damage and cell death after APAP overdose (Bajt et al., 2008, 2011; Saito et al., 2010). To investigate the effect of isolated limonoids in these events, the release of AIF into the cytosol and mitochondrial translocation of Bax were observed

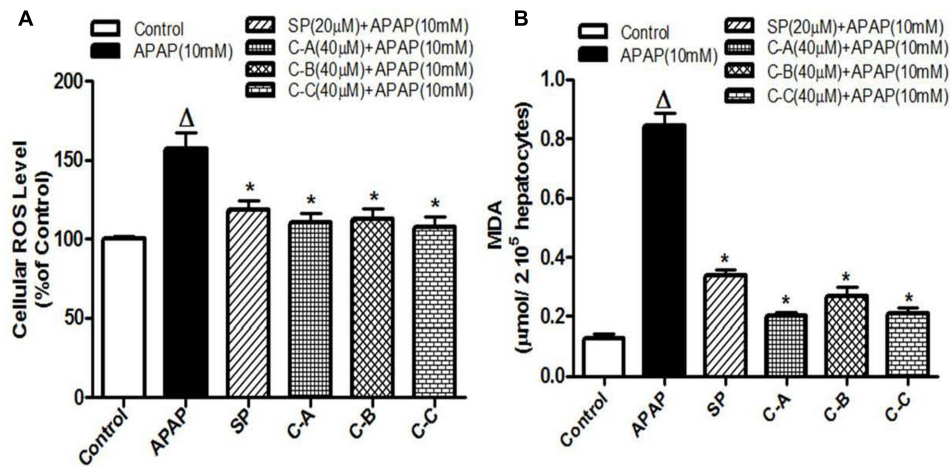


FIGURE 7 | Limonoids from *K. grandifoliola* attenuated APAP-induced oxidative stress in L-02 cells. Cells were treated without or with APAP (10 mM), or co-treated with APAP (10 mM) and isolated compounds (40 μM) or JNK inhibitor (20 μM) for 36 h. After treatment, cellular ROS level (A) and MDA concentrations (B) in the incubation medium were measured. Values are means ± SD of three independent experiments in triplicate. ANOVA analysis: $F(5,12) = 28.25, P < 0.0001$ (A) and $F(5,12) = 303.0, P < 0.0001$ (B). ^ΔValues significantly different compared to control group ($P < 0.05$); *values significantly different compared to APAP intoxicated group ($P < 0.05$) using Bonferroni's test. SP: JNK inhibitor SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

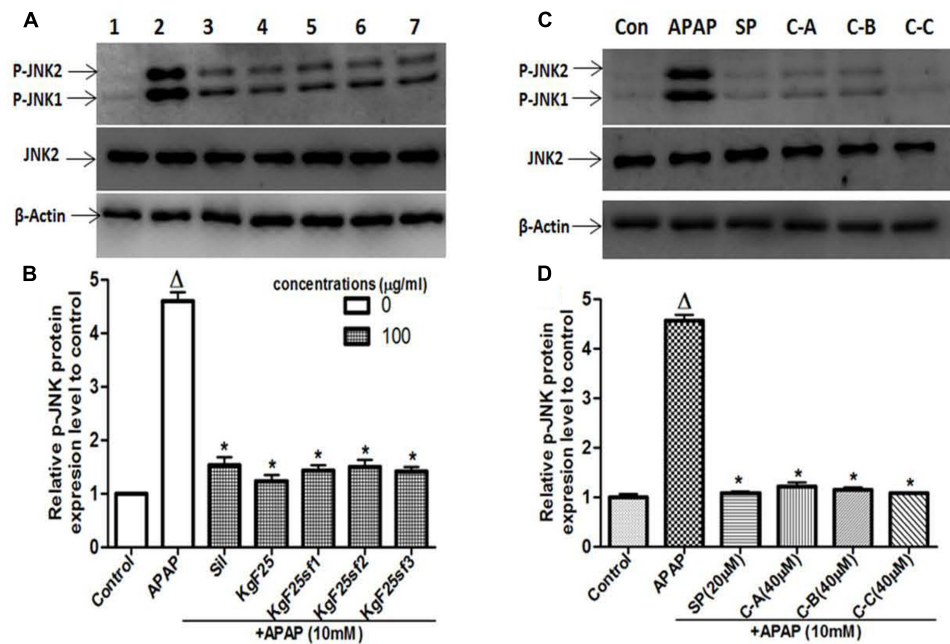


FIGURE 8 | Active sub-fractions and isolated limonoids prevented APAP-induced JNK activation. Cells were treated without or with APAP (10 mM), or co-treated with APAP (10 mM) and active sub-fractions or silymarin (100 μg/mL), isolated limonoids (40 μM) or JNK inhibitor (20 μM) for 6 h. After treatment, total proteins were extracted from cells and the lysates were probed for JNK2 and p-JNK by western blotting. β-actin was used as loading control. Each blot represents one of three independent experiments. (A,C) Effect of active sub-fractions and isolated compounds on JNK activation, respectively. (B,D) Densitometry analysis of blots, respectively, for active sub-fractions and isolated compounds. Values are means ± SD of three independent experiments in triplicate. ANOVA analysis: $F(6,14) = 322.0, P < 0.0001$ (B) and $F(5,12) = 1162.0, P < 0.0001$ (D). ^ΔValues significantly different compared to control group ($P < 0.05$); *values significantly different compared to APAP intoxicated group ($P < 0.05$) using Bonferroni's test. Lane1: control; Lane2: APAP; Lane3: silymarin+APAP; Lane4: KgF25+APAP; Lane5: KgF25s1+APAP; Lane6: KgF25s2+APAP; Lane7: KgF25s3+APAP. Sil: silymarin; KgF25: methylene chloride/methanol (75:25, v/v) fraction of *K. grandifoliola*; KgF25s1: sub-fraction 1 of KgF25; KgF25s2: sub-fraction 2 of KgF25; KgF25s3: sub-fraction 3 of KgF25; SP: JNK inhibitor SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

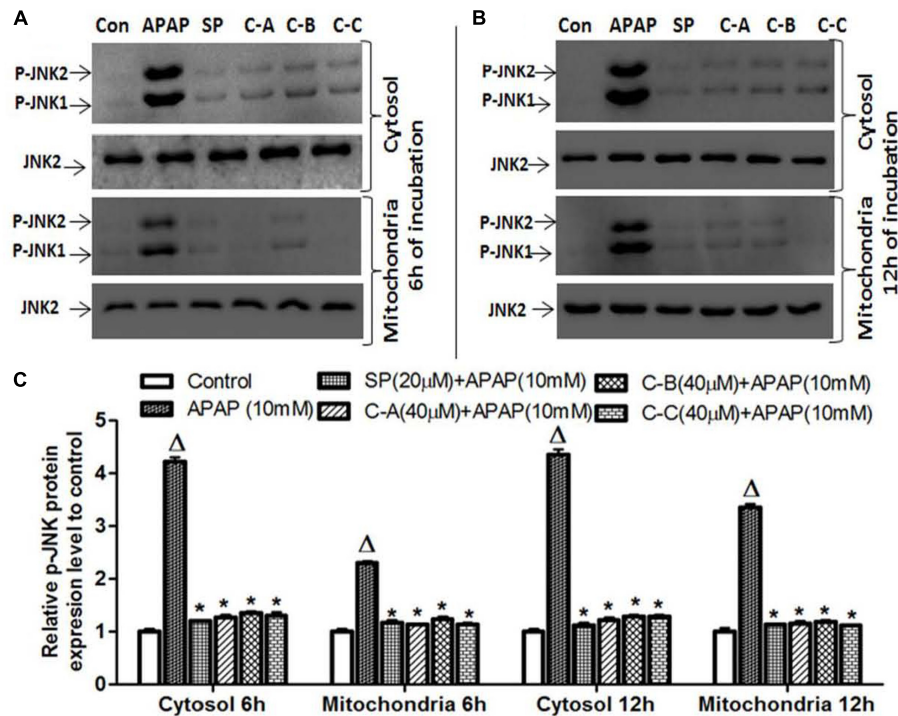


FIGURE 9 | Limonoids from *K. grandifoliola* prevented mitochondrial p-JNK translocation. Cells were treated without or with APAP (10 mM), or co-treated with APAP (10 mM) and isolated limonoids (40 μ M) or JNK inhibitor (20 μ M) for 6 and 12 h. After treatment, p-JNK level was detected into the cytosolic and mitochondrial fractions by western blotting. JNK2 was used as internal control. Each blot represents one of three independent experiments. **(A,B)** Effect of isolated compounds on JNK activation, respectively, at 6 and 12 h after treatment. **(C)** densitometry analysis of blots. Values are means \pm SD of three independent experiments in triplicate. ANOVA analysis: $F(5,12) = 1119.0$, $P < 0.0001$ and $F(5,12) = 1841.0$, $P < 0.0001$ **(C)**. ^ΔValues significantly different compared to control group ($P < 0.05$); *values significantly different compared to APAP intoxicated group ($P < 0.05$) using Bonferroni's test. SP: JNK inhibitor SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

by immunoblotting in APAP-intoxicated cells 12 h after exposure (Figures 10A,B). Co-treatment of cells with isolated compounds (40 μ M) or JNK inhibitor (20 μ M) significantly ($p < 0.05$) prevented the mitochondrial translocation of Bax and the release of AIF into the cytosol (Figures 10A,B).

Isolated Limonoid Up-Regulated Mkp-1 Protein Expression

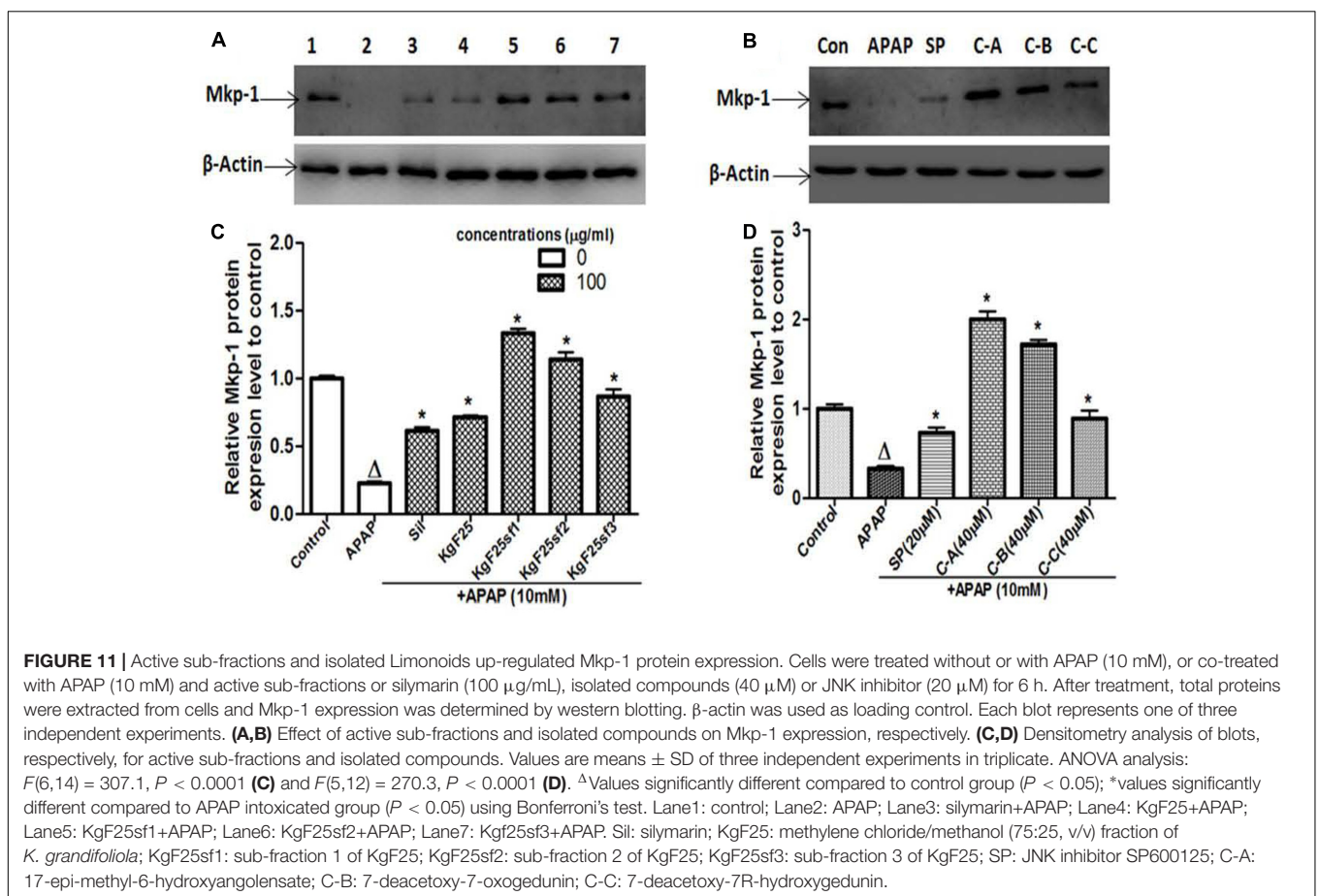
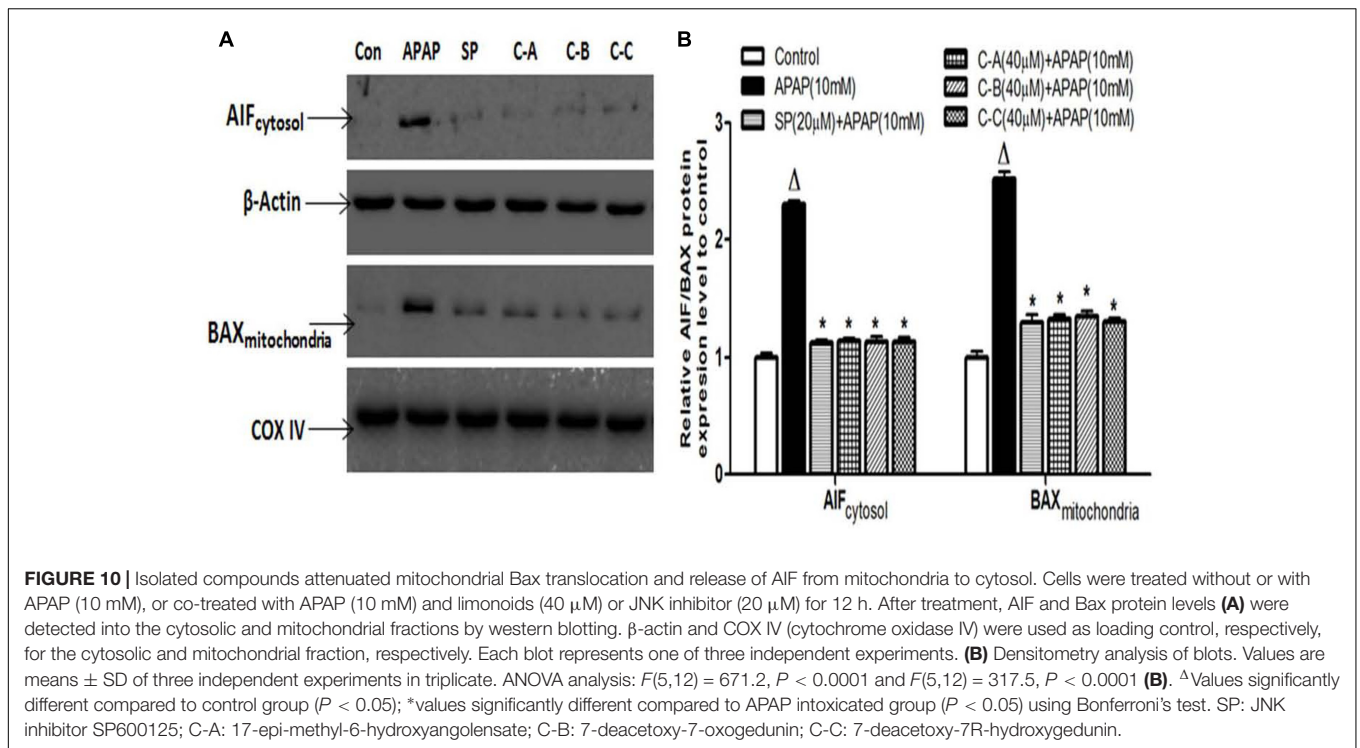
Mkp-1, a phosphatase which preferentially inactivates the stress induced by JNK activation in most tissues, has been found to protect against APAP-hepatotoxicity (Hammer et al., 2006; Wancket et al., 2012). However, overexpression of ROS decreases its expression (Kamata et al., 2005). In search of the protective mechanism of isolated limonoids from *K. grandifoliola*, the Mkp-1 protein level has been evaluated by immunoblotting. As shown in Figures 11A,B, exposure of L-02 hepatocytes for 6 h resulted in a marked decrease of Mkp-1 protein level. Co-treatment with silymarin (100 μ g/ml) (Figure 11A) or JNK inhibitor SP600125 (20 μ M) (Figure 11B) only attenuated this decreasing. However, co-treatment with active sub-fractions (100 μ g/ml) (Figures 11A,C) or isolated compounds (40 μ M) (Figures 11B,D) markedly increased the expression of Mkp-1 by up to 1.8-fold as compared to the untreated cells.

Limonoids of *K. grandifoliola* Induced Nuclear Translocation of Nrf2

Nrf2 plays a key role in the cellular antioxidant defense system by regulating the transcriptional activation of various antioxidant enzymes (Jaiswal, 2004). Therefore, western blot analysis was performed to examine the ability of isolated limonoids to induce the nuclear translocation of Nrf2. As shown in Figure 12A, co-treatment of L-02 cells with limonoids from *K. grandifoliola* induced the translocation of Nrf2 into the nucleus by up to two and threefold, respectively, at 12 h and 24 h after treatment, as compared to untreated cells. There was no obvious change in nuclear Nrf2 level of APAP or JNK inhibitor treated cells. Interestingly, 24 h after treatment, the nuclear translocation of Nrf2 was correlated to a significant ($p < 0.05$) decrease of the expression of Keap-1 (an inhibitor of Nrf2 activation) into the cytosol in limonoids co-treated cells (Figures 12A,B).

Limonoids from *K. grandifoliola* Increased mRNA Expression Levels of Antioxidants Enzymes

Gene's expression studies are useful supplements to protein examination, as the mRNA levels represent a snapshot of the cell activity at a given time. Thus, the effect of isolated



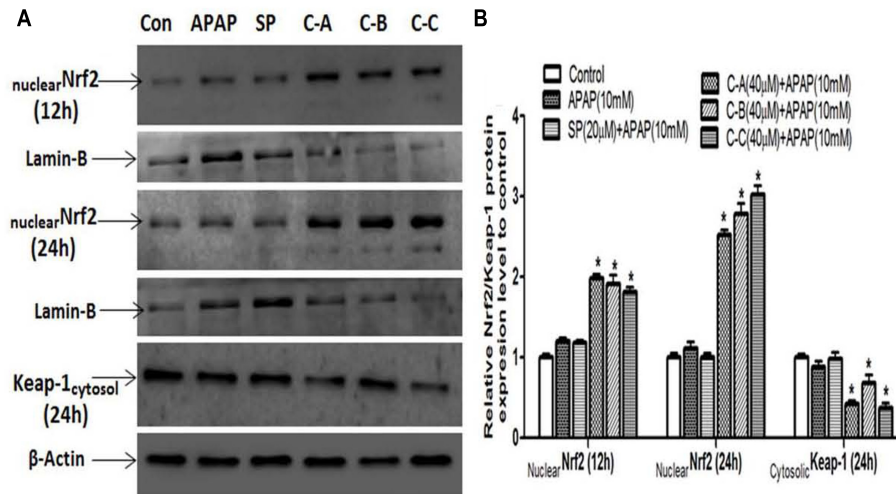


FIGURE 12 | Isolated limonoids activated Nrf2-Keap-1 antioxidant defense system. Cells were treated without or with APAP (10 mM), or co-treated with APAP (10 mM) and isolated limonoids (40 μ M) or JNK inhibitor (20 μ M) for 12 and 24 h. After treatment, Nrf2 level was detected into the nuclear fraction and Keap-1 level was detected at 24 h into the cytosolic fractions by western blotting (A). Lamin-B and β -actin were used as loading control, respectively, for the nuclear and cytosolic fraction. Each blot represents one of three independent experiments. (B) Densitometry analysis of blots. Values are means \pm SD of three independent experiments in triplicate. ANOVA analysis: $F(5, 12) = 370.8$, $P < 0.0001$ and $F(5, 12) = 48.80$, $P < 0.0001$ (B). ^ΔValues significantly different compared to control group ($P < 0.05$); *values significantly different compared to APAP intoxicated group ($P < 0.05$) using Bonferroni's test. SP: JNK inhibitor SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

limonoids was evaluated by qRT-PCR on the expression of the antioxidant enzymes, CAT, SOD1, and GST chosen as target genes of Nrf2. In parallel, the expression of MAT1A was also evaluated. As presented in **Figure 13**, exposure of cells to 10 mM APAP for 36 h significantly reduced the mRNA levels of CAT, SOD1, GST, and MAT1A. In limonoids co-treated cells, the mRNA levels of CAT (**Figure 13A**) and GST (**Figure 13C**) were increased by up-to 2.8-fold as compared to the untreated cells. Similarly, the mRNA levels of SOD (**Figure 13B**) and MAT1A (**Figure 13D**) were also increased by up-to 1.77-fold.

DISCUSSION

Previous studies conducted have shown the hepatoprotective potential of *K. grandifoliola* and a highly active fraction has been isolated (Njayou et al., 2015, 2016). The main purpose of the present study was to identify compounds from the plant bearing hepatoprotective activity and the related molecular mechanism against APAP-induced hepatotoxicity in normal human liver L-02 cells. The results showed the protective action of three isolated known limonoids (17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate, 7-deacetoxy-7-oxogedunin and deacetoxy-7R-hydroxygedunin) which was evidenced not only by their ability to alter the critical events in APAP-cell death mechanism, but also by their capacity to improve the cellular antioxidant defense system.

Acetaminophen continues to serve as an important model of DILI for phytotherapeutics and other natural compounds (Jaeschke et al., 2011, 2013). The hepatotoxicity of APAP is

initiated firstly by its bio-activation to form a reactive metabolite NAPQI, and overexpression of CYP2E1 plays a critical role in this process (Jaeschke et al., 2002). Accumulated NAPQI depletes GSH pool due to the saturation of both glucuronidation and sulfatation pathways (Hinson et al., 2010); leading to excessive generation of ROS which subsequently triggers the process of lipid membrane peroxidation and causes destruction of cells components and cell death (Jaeschke et al., 2002; Schnackenberg et al., 2009). In this study, APAP was used at the determined concentration of 10 mM. This concentration was found to be toxic for L-02 hepatocytes after 36 h of incubation leading to about 50% decrease of cell viability and great increase of ALT leakage into the incubation medium (**Figure 2**). These observations could be the consequence of metabolic activation of APAP as proven by the overexpression of CYP2E1 (**Figures 6A,B**), depletion of cellular GSH (**Figure 6E**), overproduction of ROS (**Figure 7A**) and increase formation of MDA (**Figure 7B**) when L-02 hepatocytes were incubated in presence of APAP alone. However, co-treatment of cells with active sub-fractions, isolated limonoids or JNK inhibitor dose-dependently prevented cell death and ALT leakage into the incubation medium (**Figure 4**). Likewise, significant inhibition of CYP2E1 expression (**Figures 6C,D**), restoration of cellular GSH (**Figure 6E**), attenuation of ROS generation (**Figure 7A**) and inhibition of lipid peroxidation (**Figure 7B**) were observed in limonoids co-treated cells. These results suggest that limonoids from *K. grandifoliola* protect L-02 hepatocytes against APAP-induced oxidative injury. Similarly, lupeol, a triterpenoid compound found in many plant species including mango, olive and fig was evidenced to protect primary rat hepatocytes against APAP-induced oxidative damage through inhibition of GSH

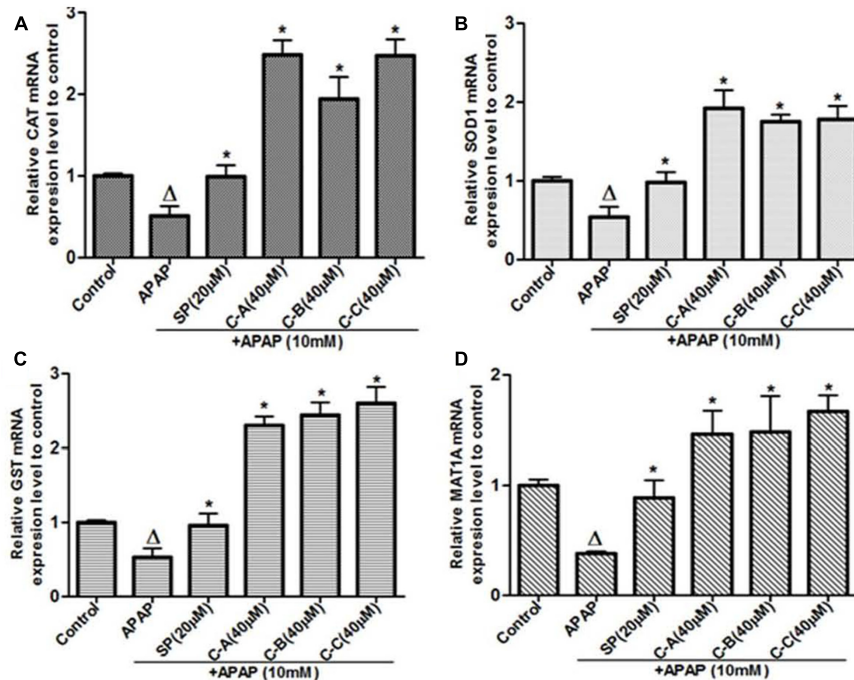


FIGURE 13 | Limonoids from *K. grandifoliola* increased mRNA levels of CAT, SOD1, GST, and MAT1A genes. Cells were treated without or with APAP (10 mM), or co-treated with APAP (10 mM) and isolated limonoids (40 µM) or JNK inhibitor (20 µM) for 36 h. After treatment, RNA was extracted from cells and relative mRNA expression level of CAT (A), SOD1 (B), GST (C), and MAT1A (D) were determined by qRT-PCR. GAPDH was used as internal control. Values are means \pm SD of three independent experiments in triplicate. ANOVA analysis: $F(5, 12) = 70.43$, $P < 0.0001$ (A); $F(5, 12) = 45.72$, $P < 0.0001$ (B); $F(5, 12) = 113.0$, $P < 0.0001$ (C); and $F(5, 12) = 20.65$, $P < 0.0001$ (D). ^ΔValues significantly different compared to control group ($P < 0.05$); *values significantly different compared to APAP intoxicated group ($P < 0.05$) using Bonferroni's test. SP: JNK inhibitor SP600125; C-A: 17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate; C-B: 7-deacetoxy-7-oxogedunin; C-C: 7-deacetoxy-7R-hydroxygedunin.

depletion, ROS production and lipid membrane peroxidation (Kumari and Kakkar, 2012b).

The second hit which plays a major role during APAP cell death mechanism has been well established as JNK activation (Gunawan et al., 2006; Hanawa et al., 2008; Saito et al., 2010). In fact, early oxidant stress which occurs after GSH depletion initiates the activation of various MAP Kinases. The activities of different kinases converge to the phosphorylation of JNK, which then translocates into the mitochondria and amplifies the mitochondrial oxidant stress (Nakagawa et al., 2008; Saito et al., 2010). This mitochondrial oxidant stress leads to the opening of the membrane permeability transition (MPT) pore with collapse of the membrane potential and cessation of ATP synthesis. In addition, opening of MPT pore causes mitochondrial Bax translocation and mitochondrial matrix swelling, with the rupture of outer membrane and the release of intermembrane proteins, such as endonuclease G and AIF, which translocate into the nucleus and induce DNA damage (Bajt et al., 2006, 2008). Taking together, these events have been recognized as the main cause of cell death (Bajt et al., 2011; Jaeschke et al., 2012; Xie et al., 2014). In support of these events in our study, phosphorylation of JNK (Figure 8), mitochondrial translocation of p-JNK (Figure 9) and Bax (Figure 10), and release of AIF into the cytosol (Figure 10) were observed in APAP-treated L-02 hepatocytes. All these parameters were effectively

attenuated when cells were co-treated with isolated limonoids and their effects were comparable to those observed in JNK inhibitor co-treated cells. These findings suggest that inhibition of JNK activation contributes to the protective effect of these limonoids. These results are also in agreement with previous reports documenting that pharmacological inhibition of JNK phosphorylation or the silencing of JNK gene expression resulted in reduced liver injury after APAP overdose (Gunawan et al., 2006; Henderson et al., 2007; Hanawa et al., 2008).

Since previous studies have demonstrated that JNK activation is a key event that perpetuates hepatocellular damage during APAP hepatotoxicity (Gunawan et al., 2006; Hanawa et al., 2008; Saito et al., 2010), we assessed the effect of isolated limonoids on the expression of Mkp-1, a primary phosphatase responsible for dephosphorylating JNK (Keyse, 2000; Hammer et al., 2006). It has been reported that Mkp-1 protects mice against APAP-hepatotoxicity (Wancket et al., 2012). However, excess ROS generated during toxic hepatic injuries inhibits Mkp-1 and prolongs JNK activation which perpetuates hepatic damage (Kamata et al., 2005; Boutros et al., 2008; Wancket et al., 2012). In this study, we observed a significant decreased of Mkp-1 protein level (Figures 11A,B) in APAP treated L-02 hepatocytes which effectively correlates with overproduction of ROS and sustained JNK activation. Co-treatment of cells with JNK inhibitor SP600125 only attenuated this decreasing

(Figure 11B). In contrast, when cells were co-treated with isolated limonoids, Mkp-1 protein levels were increased by up to 1.8-fold as compared to untreated cells. These findings suggest that inhibition of JNK activation may be due to the up-regulation of Mkp-1 expression which could therefore contribute to protect L-02 hepatocytes against APAP-toxicity.

The transcription factor Nrf2, which regulates the transcriptional activation of various antioxidant enzymes has been reported to play a key role in protecting against hepatotoxicity of several chemicals (Gum and Cho, 2013; Pang et al., 2016). Under normal condition, Nrf2 is located into the cytosol, where it forms an inactive complex with its repressor Keap-1 (Jaiswal, 2004). Upon stimulation, Nrf2 dissociates from Keap-1, translocates into the nucleus where it binds to ARE and promotes the expression of antioxidant enzymes (Niture et al., 2010). Therefore, up-regulation of Nrf2 in the nucleus can result in a reduction of ROS, and correspondingly, protects cells against APAP-toxicity. In our study, immunoblotting analysis in cells treated with APAP alone or co-treated with JNK inhibitor showed no obvious changes neither in nuclear Nrf2 protein level after 12 h or 24 h of treatment nor in cytosolic Keap-1 protein level after 24 h of treatment (Figure 12). However, in limonoids co-treated cells, the nuclear protein level was increased by up to two and threefold, respectively, at 12 and 24 h after treatment. This effect was correlated with a significant ($p < 0.05$) decrease of cytosolic Keap-1 protein level (Figure 12). Nrf2 target genes include antioxidant and detoxification enzymes as CAT, SOD1, and GST (Jaiswal, 2004). GST uses GSH to detoxicate the xenobiotic or their reactive metabolites in the liver. SOD dismutates superoxide anions into hydrogen peroxide (H_2O_2). Then, CAT metabolizes H_2O_2 to O_2 and H_2O (Kaiiska et al., 2000; Dai et al., 2006). The expression of these enzymes decreases during APAP overdose (Kumari and Kakkar, 2012a). In the present study, CAT, SOD and GST mRNA levels were significantly ($p < 0.05$) reduced in L-02 cells in response to APAP treatment alone (Figure 13). In contrast, CAT, SOD, and GST mRNA levels were significantly ($p < 0.05$) increased in limonoids co-treated cells. Taking together, these observations suggest that limonoids from *K. grandifoliola* stimulate Nrf2, which then dissociates from Keap-1, translocates into the nucleus and enhances the expression of CAT, SOD, and GST, and contributes therefore to the protection of L-02 hepatocytes against APAP-toxicity.

Methionine adenosyltransferase-1A is the enzyme responsible for the synthesis of S-adenosyl-L-methionine (SAM), the main precursor of GSH in the liver (Lieber, 2002). Previous studies report that depletion of the liver GSH content induced by various hepatotoxins is largely due to the decrease of MAT1A expression (Brown et al., 2010; Cederbaum, 2010). In our study, the significant ($p < 0.05$) decrease of MAT1A mRNA level (Figure 13D) observed in APAP-treated cells effectively correlated with the depletion of cellular GSH. Co-treatment of cells with limonoids significantly ($p < 0.05$) increased MAT1A mRNA level. These data suggest that restoration of GSH observed in limonoids co-treated cells could be due to the increase expression of MAT1A.

On a structural basis, limonoids isolated in this study are related to two groups. Compound A (17-epi-methyl-6-hydroxyangolensate) is a derivative of methylangolensate while compound B (7-deacetoxy-7-oxogedunin) and C (deacetoxy-7R-hydroxygedunin) derive from gedunin. More than one hundred different natural limonoids have been isolated and are of diverse structural and biological activities that encompass antiparasitic, anticancer, antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, antiplasmodial, antibacterial... (Tundis et al., 2014). Methylangolensate has been demonstrated to inhibit NF- κ B signaling pathway while a degradation product of limonoids, Fraxinellone exhibits anti-inflammatory activity via inhibition of I κ B kinase (IKK) and extracellular signal-related kinase (ERK1/2) phosphorylation without affecting c-Jun N-terminal kinase (JNK1/2) and p38 phosphorylation (Kim et al., 2009). Compounds B and C which are structurally close possess antiproliferative activity through modulation of the 90-kDa heat shock protein (Tundis et al., 2014). Due to the great diversity of the structure and biological activities of limonoids, extensive studies are needed in order to relate the structure type to the molecular activities. However, this study provides for the first time evidence of the action of two structurally diverse limonoids on the signaling pathway of APAP-induced hepatotoxicity in L-02 cells line through up-regulation of Mkp-1, an endogenous inhibitor of JNK phosphorylation, and nuclear translocation of Nrf2, a transcription factor that regulates the expression of numerous antioxidant enzymes.

CONCLUSION

Our findings demonstrated that limonoids isolated from *K. grandifoliola* protect normal human liver L-02 cells against APAP-induced hepatotoxicity mainly through induction of Mkp-1 and nuclear translocation of Nrf2. Also, further analysis including *in vivo* and toxicological studies are needed to select the most potent compound that may be useful as therapeutic agents against DILI.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AK, FN, and PM defined the research subject and its aims, conceived and designed the experiments. GG, FY, and PM provided facilities to perform the work. AK, RT, HH, FS, and BO prepared the compounds and performed the experiments. AK, FN, FY, and GG analyzed the data and wrote the paper. All the authors read and approved the final version of this manuscript.

FUNDING

This work was co-supported by the International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) [grant number S/CMR15-06] and the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW) [grant number F/4223-2].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Department of Biochemistry, University of Yaoundé 1 and the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences for providing the facilities to carry out this research.

REFERENCES

- Adeyemi, A., and Gbilade, A. (2006). Antianaemic activity of *Spondias mombin* and *Khaya grandifoliola* aqueous extracts on rats. *J. Pharm. Bioresour.* 3, 94–97.
- Atta-ur-Rahman, Zareen, S., Choudhary, M. I., Akhtar, M. N., and Khan, S. N. (2008). α -glucosidase inhibitory activity of Triterpenoids from *Cichorium intybus*. *J. Nat. Prod.* 71, 910–913. doi: 10.1021/np800001v
- Bajt, M. L., Cover, C., Lemasters, J. J., and Jaeschke, H. (2006). Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol. Sci.* 94, 217–225. doi: 10.1093/toxsci/kfl077
- Bajt, M. L., Farhood, A., Lemasters, J. J., and Jaeschke, H. (2008). Mitochondrial Bax translocation accelerates DNA fragmentation and cells necrosis in murine model of acetaminophen hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324, 8–14. doi: 10.1124/jpet.107.129445
- Bajt, M. L., Ramachandran, A., Yan, M. H., Lebofsky, M., Farhood, A., Lemasters, J. J., et al. (2011). Apoptosis-inducing factor modulates mitochondrial oxidant stress in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 122, 598–605. doi: 10.1093/toxsci/kfr116
- Bickii, J., Njifutie, N., Foyere, J. A., Basco, L. K., and Ringwald, P. (2000). In vitro antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Meliaceae). *J. Ethnopharmacol.* 69, 27–33. doi: 10.1016/S0378-8741(99)00117-8
- Boutros, T., Nantel, A., Emadali, A., Tzinmas, G., Conzen, S., Chevet, E., et al. (2008). The MAP Kinase phosphatase-1 Mkp-1/DUSP-1 is a critical regulator of human liver response to transplantation. *Am. J. Transplant.* 8, 2558–2568. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02420.x
- Brown, J. M., Ball, J. G., Hogsett, A., Williams, T., and Valentinovic, M. (2010). Temporal study of acetaminophen (APAP) and S-adenosyl-L-methionine (SAMe) effects sub-cellular hepatic SAMe levels and methionine adenosyltransferase (MAT) expression and activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 247, 1–9. doi: 10.1016/j.taap.2010.04.018
- Buege, J., and Aust, S. (1978). The thiobarbituric acid assay. *Methods Enzymol.* 52, 306–307.
- Cederbaum, A. I. (2010). Hepatoprotective effects of S-adenosyl-L-methionine against alcohol- and cytochrome P450 2E1-induced liver injury. *World J. Gastroenterol.* 16, 1366–1376. doi: 10.3748/wjg.v16.i11.1366
- Chen, S., Zou, L., Li, L., and Wu, T. (2013). The protective effect of Glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced chronic liver fibrosis via up-regulation of Nrf2. *PLOS ONE* 8:e53662. doi: 10.1371/journal.pone.0053662
- Dai, G., He, L., Chou, N., and Wan, Y. J. (2006). Acetaminophen metabolism does not contribute to gender difference in its hepatotoxicity in mouse. *Toxicol. Sci.* 92, 33–41. doi: 10.1093/toxsci/kfj192
- Ellman, G. L. (1959). Plasma antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6
- Falodun, A., Poh, C. F., and Adelusi, S. A. (2009). Phytochemical and anti-inflammatory evaluation of *Khaya grandifoliola* stem bark extract. *Int. J. PharmTech Res.* 1, 1061–1064.
- Gum, S., and Cho, M. K. (2013). Recent updates on acetaminophen-hepatotoxicity: the role of Nrf2 in hepatoprotection. *Toxicol. Res.* 29, 165–172. doi: 10.5487/TR.2013.29.3.165
- Gunawan, B. K., Liu, Z., Han, D., Hanawa, N., Gaarde, W. A., and Kaplowitz, N. (2006). c-Jun N-terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 131, 165–178. doi: 10.1053/j.gastro.2006.03.045
- Hammer, M., Mages, J., Dietrich, H., Servatus, A., Howells, N., Cato, A. C., et al. (2006). Dual specificity phosphatase-1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J. Exp. Med.* 203, 15–20. doi: 10.1084/jem.20051753
- Hanawa, N., Shinohara, M., Saberi, B., Gaarde, W. A., Han, D., and Kaplowitz, N. (2008). Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J. Biol. Chem.* 283, 13565–13577. doi: 10.1074/jbc.M708916200
- Henderson, N. C., Pollock, K. J., Frew, J., Mackinnon, A. C., Flavel, R. A., Davis, R. J., et al. (2007). Critical role of c-Jun (NH2) terminal kinase in paracetamol-induced acute liver failure. *Gut* 56, 982–990. doi: 10.1136/gut.2006.104372
- Hinson, J. A., Roberts, D. W., and James, L. P. (2010). Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 196, 369–405. doi: 10.1007/978-3-642-00663-0_12
- Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D., and Lemasters, J. J. (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65, 166–176. doi: 10.1093/toxsci/65.2.166
- Jaeschke, H., McGill, M. R., and Ramachandran, A. (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* 44, 88–106. doi: 10.3109/03602532.2011.602688
- Jaeschke, H., McGill, M. R., Williams, C. D., and Ramachandran, A. (2011). Current issues with acetaminophen hepatotoxicity—a clinically relevant model to test the efficacy of natural products. *Life Sci.* 88, 737–745. doi: 10.1016/j.lfs.2011.01.025
- Jaeschke, H., Williams, C. D., McGill, M. R., Xie, Y., and Ramachandran, A. (2013). Models of drug-induced liver injury for evaluation of phytotherapeutics and other natural products. *Food Chem. Toxicol.* 55, 279–289. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.063
- Jaeschke, H., Xie, Y., and McGill, M. R. (2014). Acetaminophen-induced liver injury: from animal models to humans. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 2, 153–161.
- Jaiswal, A. K. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1199–1207. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.074
- Ji, L., Liu, T., Chen, Y., and Wang, Z. (2009). Protective mechanisms of N-Acetylcysteine against pyrrolizidine alkaloid clivorine-induced hepatotoxicity. *J. Cell. Biochem.* 108, 424–432. doi: 10.1002/jcb.22269
- Kaiiska, M. B., Gladen, B. C., and Baird, D. D. (2000). Biomarkers of oxidative stress study: are plasma antioxidants markers of CCl4 poisoning? *Free Radic. Biol. Med.* 28, 838–845. doi: 10.1016/S0891-5849(00)00198-2
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirita, H., and Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinases phosphatases. *Cell* 120, 649–661. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.041
- Keyse, S. M. (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 186–192. doi: 10.1016/S0955-0674(99)00075-7
- Kim, W., Fan, Y. Y., Smith, R., Patil, B., Jayaprakasha, G. K., McMurray, D. N., et al. (2009). Dietary curcumin and limonin suppress CD4⁺ T-cell proliferation and interleukin-2 production in mice. *J. Nutr.* 139, 1042–1048. doi: 10.3945/jn.108.102772
- Kumari, A., and Kakkar, P. (2012a). Lupeol prevents acetaminophen-induced in vivo hepatotoxicity by altering Bax/Bcl-2 and oxidative stress-mediated mitochondrial signaling cascade. *Life Sci.* 90, 561–570. doi: 10.1016/j.lfs.2012.01.012
- Kumari, A., and Kakkar, P. (2012b). Lupeol protects against acetaminophen-induced oxidative stress and cell death in rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1781–1789. doi: 10.1016/j.fct.2012.02.042
- Lieber, C. S. (2002). S-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 1183S–1187S.
- Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I., Sumaya-Martínez, M. T., Gutiérrez-Salinas, J., Bautista, M., et al. (2014). Review of natural products with hepatoprotective effects. *World J. Gastroenterol.* 20, 14787–14804. doi: 10.3748/wjg.v20.i40.14787
- Makinde, J. M., Awe, S. O., and Agbedahunsi, J. M. (2006). Effect of *Khaya grandifoliola* extract on *Plasmodium berghei berghei* in mice. *Phytother. Res.* 2, 30–32. doi: 10.1002/ptr.2650020104

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00653/full#supplementary-material>

- Moundipa, P. F., Njayou, F. N., Yanditoum, S., Sonké, B., and Tchouanguép, F. M. (2002). Medicinal plants used in Bamun region of the western province of Cameroon against jaundice and other liver disorders. *Cam. J. Biochem. Sci.* 12, 39–46.
- Nakagawa, H., Maeda, S., Hikiba, Y., Ohmae, T., Shibata, W., Yanai, A., et al. (2008). Deletion of apoptosis signal-regulating kinase-1 attenuates acetaminophen-induced liver injury by inhibiting c-Jun N-terminal kinase activation. *Gastroenterology* 135, 1311–1321. doi: 10.1053/j.gastro.2008.07.006
- Niture, S. K., Kaspar, J. W., Shen, J., and Jaiswal, A. K. (2010). Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244, 37–42. doi: 10.1016/j.taap.2009.06.009
- Njayou, F. N., Amougou, A. M., Tsayem, R. F., Manjia, J. N., Rudraiah, S., Bradley, B., et al. (2015). Antioxidant fractions of *Khaya grandifoliola* C. DC., and *Entada africana* Guill et Perr. induce nuclear translocation of Nrf2 in HC-04 cells. *Cell Stress Chaperon.* 20, 991–1000. doi: 10.1007/s12192-015-0628-6
- Njayou, F. N., Galani, T. B. R., Ngadjui, T. B., and Moundipa, F. P. (2013). Hepatoprotective activity of three Cameroonian medicinal plants against oxidative damages induced by paracetamol and CCL4 in primary rat hepatocytes. *Int. J. Pharm. Photon.* 104, 306–314.
- Njayou, F. N., Kouam, A. F., Simo, F. B. N., Tchana, A. N., and Moundipa, P. F. (2016). Active chemical fractions of stem bark extract of *Khaya grandifoliola* C. DC. and *Entada africana* Guill et Perr. synergistically protect primary rat hepatocytes against paracetamol-induced damage. *BMC Complement. Altern. Med.* 16:190. doi: 10.1186/s12906-016-1169-y
- Nourjah, P., Ahmad, S. R., Karwoski, C., and Willy, M. (2006). Estimates of acetaminophen (Paracetamol)-associated overdoses in the United States. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 15, 398–405. doi: 10.1002/pds.1191
- Odugbemi, T. O., Akinsulure, O. R., Aibinu, I. E., and Fabeku P. O. (2007). Medicinal plants useful for malaria therapy in Okeigbo, Ondo State, Southwest Nigeria. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 4, 191–198.
- Olowokudejo, J. D., Kadiri, A. B., and Travih, V. A. (2008). An ethnobotanical survey of herbal markets and medicinal plants in Lagos State of Nigeria. *Ethnobot. Leaf.* 12, 851–865.
- Onifade, A. K. (2006). Effect of essential oils of some Meliaceae plants on aflatoxin production and growth of *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Technol.* 4, 322–324.
- Pang, C., Zheng, Z., Shi, L., Sheng, Y., Wei, H., Wang, Z., et al. (2016). Cafeic acid prevents acetaminophen-induced liver injury by activating the Keap1-Nrf2 antioxidative defense system. *Free Radic. Biol. Med.* 91, 236–246. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.024
- Reitman, S., and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic acid, glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56–58. doi: 10.1093/ajcp/28.1.56
- Saito, C., Lemasters, J. J., and Jaeschke, H. (2010). c-Jun N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 246, 8–17. doi: 10.1016/j.taap.2010.04.015
- Schnackenberg, L. K., Chen, M., Sun, J., Holland, R. D., Dragan, Y., Tong, W., et al. (2009). Evaluation of trans-sulfuration pathways in multiple liver toxicity studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235, 25–32. doi: 10.1016/j.taap.2008.11.015
- Singh, R., Wang, Y., Tanaka, K. E., Gaarde, W. A., and Czaja, M. J. (2009). Differential effects of JNK1 and JNK2 inhibition on murine steatohepatitis and insulin resistance. *Hepatology* 49, 87–96. doi: 10.1002/hep.22578
- Stephen, U. A., Abiodun, F., Osahon, A., and Ewaen, E. (2009). Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Khaya grandifoliola* stem bark. *J. Biol. Sci.* 9, 63–67. doi: 10.3923/jbs.2009.63.67
- Tanaka, Y., Sakamoto, A., Inoue, T., Kikuchi, T., Kajimoto, T., Muraoko, O., et al. (2012). Andriolides H-P from flower of andiroba (*Carapa guianensis*, (Meliaceae). *Tetrahedron* 68, 3669–3677. doi: 10.1016/j.tet.2011.12.076
- Tanaka, Y., Yamada, T., In, Y., Muraoko, O., Kajimoto, T., and Tanaka, R. (2011). Absolute stereostructure of Andriolides A-G from the flowers of *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Tetrahedron* 67, 782–792. doi: 10.1016/j.tet.2010.11.028
- Tundis, R., Loizzo, R. M., and Menichini, F. (2014). An overview on chemical aspects and potential benefits of limonoids and their derivatives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 225–250. doi: 10.1080/10408398.2011.581400
- Wancket, L. M., Meng, X. M., Rogers, L. K., and Liu, Y. (2012). Mitogen-activated protein kinase phosphatase (Mkp)-1 protects mice against acetaminophen-induced hepatic injury. *Toxicol. Pathol.* 40, 1095–1105. doi: 10.1177/1092623312447551
- Wang, X., and Liu, Y. (2007). Regulation of innate immune response by MAP Kinase phosphatase-1. *Cell. Signal.* 19, 1372–1382. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.03.013
- Xiao, F., Li, Y., Luo, L., Xie, Y., Zeng, M., Wang, A., et al. (2014). Role of mitochondrial electron transport chain dysfunction in Cr(IV)-induced cytotoxicity in L-02 hepatocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 33, 1013–1025. doi: 10.1159/000358672
- Xie, Y., McGill, M. R., Dorko, K., Kumer, S. C., Schmitt, T. M., Forster, J., et al. (2014). Mechanisms of acetaminophen-induced cell death in primary human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279, 266–274. doi: 10.1016/j.taap.2014.05.010
- Yuan, T., Zhu, R., Zhang, H., Odeku, O. A., Yang, S., Liao, S., et al. (2010). Structure determination of grandifotane A from *Khaya grandifoliola* by NMR, X-ray diffraction, and ECD calculation. *Org. Lett.* 12, 252–255. doi: 10.1021/ol902565s

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Kouam, Yuan, Njayou, He, Tsayem, Oladejo, Song, Moundipa and Gao. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.