

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie Appliquée



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Activité hépatoprotectrice de l'extrait brut
de bourgeons de *Populus nigra* chez des
souris intoxiquées par le paracétamol**

Présenté par :

BENSADI Farida & OURABAH Asma

Soutenu le : **13 Juin 2015**

Devant le jury, composé de :

Mme B. KHETTAL	MCA	Présidente
Mme N. DEBBACHE	MCB	Encadreur
Mr S. OUCHEMOUKH	MCA	Examineur
Mme I. CHEBOUT		Invitée

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Louange à Dieu le Tout Puissant de nous avoir donné le courage et la patience de réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier chaleureusement et très particulièrement notre promotrice Mme DEBBACHE N., pour son aide, ses conseils, son orientation et sa grande disponibilité à toute épreuve. Qu'elle sache que ses qualités humaines exceptionnelles et sa rigueur scientifique ne nous ont pas laissées indifférentes. Qu'elle trouve ici l'expression de notre haute gratitude.

Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres du jury :

- ✓ Mme KHETTAL B. pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury*
- ✓ Mr OUCHEMOUKH S. d'avoir accepté de faire partie du jury et de donner de son temps pour examiner ce travail.*

Nous tenons aussi à exprimer notre reconnaissance au Pr. ATMANI D. pour nous avoir accueillies dans son laboratoire.

Nos remerciements vont également à tout le personnel du laboratoire génétique : Mme ATMANI D., Mme RAHMANI M., Mlle AYOUNI K., Mlle CHERAFT N., Mlle TAHIRI, Mlle SEBAIHI S., Mlle CHARHIR N., Ghania, Lila, Naima, Farah, Kenza, Saliha, Zineb, Radia et Nadjia.

Notre reconnaissance va également à Mr. HAMMOUM, Chef du Département de Biologie Physico-chimique et à tous les enseignants.

Nous tenons à remercier également le Dr. CHEBOUT I pour nous avoir acceptées au sein du service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique au niveau de l'hôpital Frantz Fanon - Béjaia- ainsi qu'au personnel de ce service.

Nos remerciements vont également au personnel de l'EPSP d'Ihaddaden et de Sidi Ahmed - Bejaia- pour leur accueil.

Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Asma & Farida

Dédicace

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

- ✚ A Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la volonté à réaliser ce travail*

- ✚ A mes très chers parents pour leur amour, leur soutien, leurs encouragements pour tout ce qu'ils m'ont apporté et les valeurs qu'ils m'ont enseignées. Je ne vous remercierai jamais assez. Que dieu vous procure bonheur, santé et longue vie. Que ce travail soit pour vous un motif de fierté et de satisfaction. Je vous aime énormément
Maman et Papa*

- ✚ A mes deux chères et adorables sœur Farah et Salma. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de succès.*

- ✚ A la mémoire de mes grands parents qui auraient tant aimé assister à cet exploit. Que Dieu les accueille en son vaste paradis.*

- ✚ A mes tantes, oncles, cousins, cousines, voisines et à toute la grande famille.*

- ✚ A tous les profs qui m'ont enseignée depuis le premier palier jusqu'à ce niveau particulièrement Mme DEBBACHE N., Mme KHETTAL B., et Mr OUCHEMOUKH S. Sachez que vous êtes, pour moi, un exemple édifiant devant me servir de référence.*

- ✚ A mes amies : Hanane, Damia, Khira, Zina, Djidji, Nacera, Ghania, Lila, et Mamiche.*

- ✚ A mes amies sportives : Dalila, Fatiha, Nesrine, Ourida, Arezki, Wahab, Sabrina et Rima.*

- ✚ A ma meilleure amie et super binôme Farida ainsi que sa famille.*

- ✚ A toute la promotion Biochimie appliquée et à tout le personnel du laboratoire de Génétique.*

Pour tous, je dis : si merci veut dire tout, alors merci pour tout. (Dixit B. Amrani)

Asma

A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A ma chère promotrice, Mme DEBBACHE, merci d'avoir été si patiente avec moi et de m'avoir aidée dans les moments les plus difficiles. L'ouverture de votre esprit, vos qualités humaines et vos discussions avec nous m'ont laissée une large marge de liberté qui m'a apporté une compréhension plus approfondie sur le plan scientifique et même sur la vie. Vous resterez toujours mon excellent exemple.

A mes chers parents, pour votre amour, vos sacrifices, vos encouragements, Pour tout ce que vous m'avez apportée et les valeurs que vous m'avez enseignée. Pour votre soutien et votre confiance notamment durant mes études. Je vous dis que c'est grâce à vous que je suis ce que je suis aujourd'hui.

Alors merci pour tout ce que vous m'avez donné et vous me donnerez encore.

Vous êtes les êtres les plus chers à mon cœur. Que DIEU vous procure du bonheur, de la santé et vous accorde une belle longue vie à mes côtés. Et surtout pour vous Maman, vous êtes et vous restez ma meilleure amie.

A ma chère Grand-mère, que je remercie pour tous ses prières pour moi.

A mes chers frères Abd-Elaziz, Kamel, Youcef, Abd-Elwahab et Fouad.

A mes oncles, mes tantes et leurs familles, spécialement mon oncle Alili qui a tout fait pour ce jour-là

A mes deux belles mères qui m'ont beaucoup encouragée.

A mon fiancé Karim qui m'a soutenue et était compréhensible durant mon stage.

A toutes les familles BENSADI, MAHDI et BENDJAGHLOUL.

A mes chères amies Dalila, Kahina, Souad et à toutes leurs familles. Et surtout à ma compagne de route ma très chère, ma super binôme, Asma et sa famille, je ne pourrai pas te remercier, tu étais compréhensible et à mes cotes durant les moments les plus difficiles, je n'oublierai jamais tes encouragements et ton soutien. Je souhaite de mon cœur que tu pourras continuer le chemin qu'on a commencé ensemble, tu le mérites.

Et je tiens a remercié infiniment oncle Houcine le père de Asma qui nous a beaucoup aidées.

Sans oublier mes voisins de paillasse Nacira, Djidji, Yasmina, Kahina, Hanane, Lilia, Tarik, et tous ceux qui ont effectué leur stage dans le laboratoire de génétique. Ainsi qu'à toute la promotion Biochimie appliquée 2014/2015.

A tous le personnel de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et du laboratoire de Génétique, particulièrement à Ghania et leila. Et surtout à tous les enseignants qui ont participé à la réalisation de toutes mes études.

Enfin, que tous ceux qui ont contribués, de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Et, merci à tous ceux que j'ai oublié, qu'ils m'en excusent....

Farida

Merci à tous pour tous ces souvenirs qui resteront toujours gravés dans ma mémoire.

Farida

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Chapitre I: Revue Bibliographique.

I.1- Foie	3
I.1.1- Segmentation et vascularisation	3
I.1.2- Unité fonctionnelle du foie	3
I.1.3- Différents types de cellules hépatiques	4
I.1.4- Fonctions du foie	4
I.1.4.1- Métabolisme.....	5
I.1.4.2- Stockage des minéraux et des complexes vitaminiques	6
I.1.4.3- Epuration	6
I.2-Paracetamol et hepatotoxicite	7
I.2.1- Absorption et distribution	8
I.2.2- Mode d'action	8
I.2.2- Elimination	9
I.2.4- Mécanismes de l'hépatotoxicité par le paracétamol	10
I.2.4.1- Formation des adduits protéiques	11
I.2.4.2- Transition de la perméabilité mitochondrial.....	11
I.2.4.3- Peroxydation lipidique	12
I.2.4.4- Inflammation	14
I.3- Systèmes de défense	15
I.3.1- Molécules endogènes enzymatiques.....	15
I.3.2- Molécules endogènes non enzymatiques	15
I.3.3- Molécules de défense exogène	16
I.3.3.1- Vitamines	16
I.3.3.2- Métabolites secondaires	16

I.4- <i>Populus nigra</i>	20
I.4.1- Description.....	20
I.4.2- Classification	21
I.4.3- Usage traditionnelle	21
I.4.4- Etudes antérieures sur <i>Populus nigra</i>	21

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II. 1- Matériels.....	23
II.1.1- Matériel végétale.....	23
II.1.2- Matériel animal et conditions d'élevage	23
II.1.3- Appareillages et produits chimiques	24
II. 2- Méthodes	24
II.2.1- Préparation de l'extrait	24
II.2.2- Evaluation de l'effet hépatoprotecteur contre l'intoxication par le paracétamol.....	25
II.2.2.1- Principe	25
II.2.2.2- Protocole expérimental	26
II.2.2.3- Dosage sanguin des transaminases.....	27
II.2.2.4- Préparation des homogénats du foie	28
II.2.2.5- Dosage des protéines dans les homogénats du foie	28
II.2.2.6- Dosage hépatique du malondialdéhyde (MDA).....	29
II.2.2.7- Etude histopathologique du foie	30
II.2.3- Analyse des résultats.....	31

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1- Résultats	32
III.1.1- Evaluation des niveaux sériques des transaminases (ALAT et ASAT).....	32
III.1.1.1- Effet de l'extrait sur les taux des transaminases chez des souris normale.....	32

II.1.1.2- Effet de l'extrait sur les taux des transaminases chez des souris traitées par le paracétamol.....	33
III.1.2- Evaluation des taux hépatiques de MDA	34
III.1.2.1- Effet de l'extrait sur les taux hépatiques de MDA chez des souris normales	34
II.1.2.2- Effet de l'extrait sur les taux hépatiques de MDA chez des souris traitées par le paracétamol.....	34
II.1.3- Etude histopathologique du foie.....	36
III.2- Discussion.....	39
Conclusion et perspectives.....	45
Références bibliographiques.....	46
Annexes	

Liste des abréviations

4-HNE: 4-hydroxynonéal.

ALAT: Alanine aminotransférase.

AM404: N-arachidonoyl phénolamine.

ANOVA: Analysis of variance.

ARE: Antioxydant response element.

ASAT: Aspartate aminotransférase.

BSA: Bovine serum albumin.

CMC: Carboxy méthyl cellulose.

COX: Cyclooxygénase.

CYP 450: Cytochrome P 450.

EDTA: Ethylène diamine tétra-acétique.

EFSA Journal: European food safety authority journal.

EPAC: Ester phénéthylque de l'acide caféique.

ERK 2: Extracellular signal-regulated kinase 2.

GSH: Glutathion réduit.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

HE: Hématoxyline-éosine.

IKK: IκB kinase.

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1.

LDL: Low density lipoprotein.

MAPK: Mitogen activated protein kinase.

MDA: Malondialdéhyde.

MPT: Mitochondrial permeability transition.

NAC: N-acétylcystéine.

NAD⁺: Forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide.

NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide.

NAPQI: N-acétyl p-benzoquinone-imine.

NFκB: Nuclear Factor for the κ chain of B cells.

NO[•]: Oxyde nitrique.

NOSi: Oxyde nitrique synthase inductible.

Nrf 2: Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2.

O₂^{•-}: Superoxyde.

OH[•]: Radical hydroxyle.

ONOO^{•-}: Peroxynitrite.

P. nigra: *Populus nigra*.

P/V: Poids/Volume.

PCM: Paracétamol.

SDS: Sodium dodecyl sulfate.

SEM: Standard error of the mean.

SOD: Superoxyde dismutase.

TBA: Thiobarbituric acid.

TNFα: Tumor necrosis factor α.

UI: Unité internationale.

Liste des figures

Figure	Titre	page
1	La structure du foie.	3
2	La représentation de l'unité fonctionnelle du foie.	4
3	Les différents types de cellules hépatiques.	4
4	La structure chimique du paracétamol.	8
5	Le mode d'action du paracétamol.	9
6	Le métabolisme du paracétamol.	10
7	Les mécanismes de l'hépatotoxicité par le paracétamol.	12
8	Les étapes de la peroxydation lipidique.	13
9	La voie NFκB.	14
10	Le mode d'action de quelques enzymes antioxydantes.	15
11	Le recyclage de la vitamine E et C.	16
12	La structure des flavonoïdes.	18
13	La voie Nrf2/Keap1.	19
14	La voie ERK/MAPK.	20
15	L'arbre de <i>Populus nigra</i> .	21
16	La structure chimique de quelques composés de <i>Populus nigra</i> .	22
17	Les bourgeons de <i>Populus nigra</i> .	23
18	Le complexe MDA-TBA.	30
19	L'Effet de l'extrait sur les taux hépatiques de MDA chez des souris normales.	34
20	L'effet de l'extrait sur les taux hépatiques de MDA chez des souris intoxiquées par le paracétamol (400 mg/kg).	35

21	Les pourcentages d'inhibitions de l'extrait sur les taux hépatiques de MDA chez des souris intoxiquées par le paracétamol (400 mg/kg).	36
22	Observation microscopique des coupes de foie chez des souris ayant reçu le véhicule et l'extrait brut à 100 et 300 mg/kg.	37
23	Observation microscopique des coupes de foie chez des souris ayant reçu le véhicule, la silymarine, l'extrait 100 mg/kg et 300 mg/kg suivi d'une dose de PCM (400 mg/kg).	38

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Les différents appareils et produits chimiques utilisés.	24
II	La répartition des groupes et les différents traitements.	26
III	L'effet de l'extrait sur les taux sériques des transaminases chez des souris normales.	32
IV	L'effet de l'extrait sur les taux sériques des transaminases chez des souris intoxiquées par le paracétamol (400mg/kg).	33

Introduction

INTRODUCTION

Le foie est le centre de la majorité des fonctions de l'organisme. Il a un rôle primordial dans le métabolisme des molécules endogènes et exogènes telles que la détoxification et l'élimination des xénobiotiques (**Poirier et al., 1975**). Ces composés regroupent des produits naturels, des polluants de l'environnement et des médicaments comme le paracétamol.

Le paracétamol (PCM) a été développé en 1893 par Von Mahring et commercialisé en 1949 (**Botting, 2000**). C'est l'antalgique et l'antipyrétique le plus utilisé dans l'automédication. La prise de ce médicament, à long terme ou même une surdose à court terme, est accompagnée de risques de cytolysse hépatique. Aux États-Unis, le paracétamol est responsable d'environ la moitié des cas d'insuffisance hépatique aiguë (**Mitchell et al., 2011**).

L'hépatotoxicité par le PCM est attribuée à son métabolite très réactif, le N-acétylpara-benzoquinone-imine (NAPQI) qui, à grande concentration, épuise les réserves du glutathion. Ceci engendre la formation des adduits protéiques (**Reid et al., 2005**), la peroxydation lipidique (**Favier, 2003**), l'inflammation (**Kim et al., 2010**) et l'altération de la perméabilité mitochondriale (**Reid et al., 2005**). Ces événements conduisent à la mort hépatocellulaire par nécrose.

La N-acétylcystéine (NAC) est un antidote dérivé de la cystéine, fréquemment utilisée lors de l'intoxication par le PCM (**Katzung, 2006**), mais cette molécule possède des effets secondaires tels que l'hypotension (**Larocque, 2013**). Pour cela, la recherche des composés d'origine naturelle dotés de l'effet hépatoprotecteur a fait l'objet de nombreux chercheurs. Plusieurs extraits de plantes médicinales, testés contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol, se sont avérés être des agents hépatoprotecteurs prometteurs dans les applications pharmaceutiques (**Pandy et al., 2012; Liu et al., 2011**).

Populus nigra est une plante riche en métabolites secondaires et largement utilisée en phytothérapie traditionnelle (**Fournier, 2010**). Les études antérieures ont montré que cette plante possède des activités biologiques importantes telles que l'activité antibactérienne (**Vardar-Ünlü et al., 2008**), anti-inflammatoire (**Karawya et al., 2010**) et antioxydant (**Warnant et al., 2004**). Récemment, l'activité anti-peroxydation lipidique *in vitro* a été élucidée par Debbache et ses collaborateurs (2014). Vu que la peroxydation lipidique est l'un des principaux mécanismes de l'hépatotoxicité, l'évaluation de l'effet anti-peroxydation lipidique *in vivo* de cette plante pourrait protéger le foie contre une éventuelle hépatotoxicité.

INTRODUCTION

L'objectif de ce travail est d'évaluer *in vivo* l'effet hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique de bourgeons de *Populus nigra* contre une intoxication induite par le paracétamol chez la souris. Cette évaluation est basée sur la mesure des niveaux sériques des transaminases, les taux hépatiques du malondialdéhyde ainsi que l'examen de l'aspect histologique des foies. A notre connaissance, aucune investigation n'a été déjà réalisée sur l'activité hépatoprotectrice des bourgeons de *Populus nigra* contre l'intoxication par le paracétamol.

*Revue
Bibliographique*

I.1- FOIE

Le foie est l'organe viscéral le plus volumineux du corps humain. C'est une glande abdominale unique et asymétrique appartenant au système digestif de couleur rouge brun (Figure 1). Il est situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen, dans la zone appelée hypochondre droit, juste sous la cage thoracique et le diaphragme (Flament *et al.*, 1982).

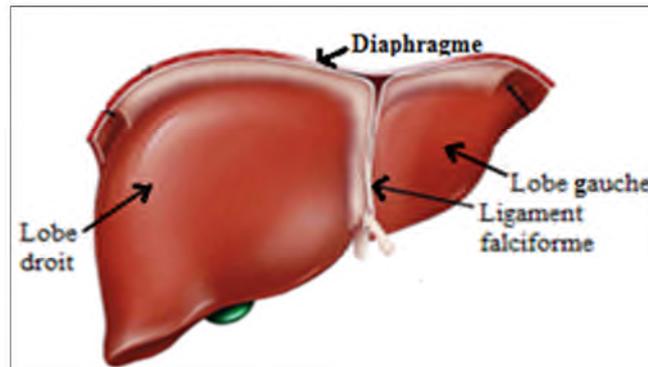


Fig.1: La structure du foie (Adaptée de Abdel-Misih et Bloomston, 2010).

I.1.1- Segmentation et vascularisation

Le foie est divisé, grâce au ligament falciforme, en deux lobes. Un grand lobe hépatique droit et un plus petit lobe gauche, avec une subdivision en 4 segments pour chacun. C'est l'un des organes les plus densément vascularisés du corps humain. Il contient environ 25 % du volume sanguin total du corps (Abdel-Misih et Bloomston, 2010).

I.1.2- Unité fonctionnelle du foie

Le foie est formé d'un grand nombre de lobules hépatiques constituant son unité fonctionnelle (Figure 2). Sur des préparations en coupe, les lobules hépatiques apparaissent ordonnés en prismes polygonaux. A chaque angle de ces prismes, trois lobules rentrent en contact, c'est la zone appelée «espace porte» au niveau duquel on distingue l'artère hépatique, une branche de la veine porte et un petit canalicule biliaire. Ce réseau alimente, à chaque fois, trois lobules (Menche, 2006). Ces lobules sont constitués majoritairement d'hépatocytes qui forment des lames hépatocytaires anastomosées. Chaque lame est en contact avec des capillaires sinusoides par l'intermédiaire d'un espace de Diss (Poirier *et al.*, 1975). Le sang artériel se mélange avec le sang de la veine porte dans les capillaires sinusoides qui représentent la zone d'échange avec les hépatocytes et qui se dirigent vers le centre du lobule. Au centre du lobule, ces capillaires se jettent dans la veine centro-lobulaire par laquelle

le sang quitte finalement le lobule pour rejoindre la veine cave inférieure, juste en-dessous du diaphragme (Menche, 2006).

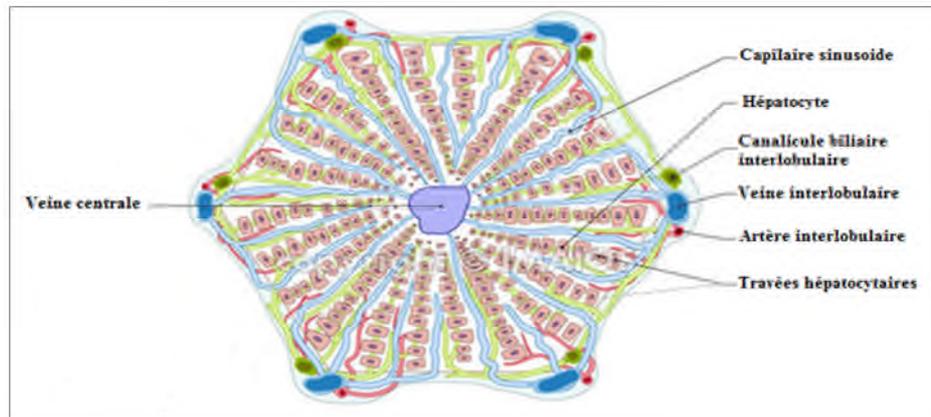


Fig. 2: La représentation de l'unité fonctionnelle du foie (Inspiré de Tortora et Derrickson, 2009).

I.1.3- Différents types de cellules hépatiques

La structure du foie est composée de 60 % de cellules parenchymateuses représentant les hépatocytes et 40 % de cellules non parenchymateuses dont les cellules sinusoidales, les cellules de Kupffer, les cellules stellaires, les cellules cholangiocytes (Rosenbaum *et al.*, 1991) et les cellules ovales (Laperche, 2003) (Figure 3).

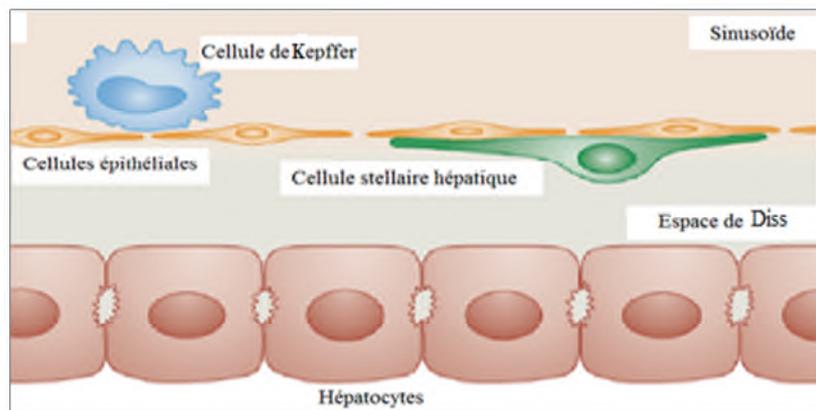


Fig. 3: Les différents types de cellules hépatiques (Adapté de Böhm *et al.*, 2010).

I.1.4- Fonctions du foie

Le foie est un organe vital et peut être considéré comme l'un des principaux régulateur de l'organisme. Il intervient dans trois grandes fonctions indispensables: le métabolisme, le stockage et l'épuration (Poirier *et al.*, 1975).

I.1.4.1- Métabolisme

❖ Glucides

Le foie est le site principal de la glycogénolyse, la glycogénogenèse et la néoglucogenèse. Ainsi, il permet de maintenir une glycémie à un taux fixe quels que soient les apports (Poirier *et al.*, 1975). De plus, il est le seul organe qui peut convertir le fructose et le galactose en glucose (Menche, 2006).

❖ Protéines

Le foie utilise les acides aminés pour la synthèse des protéines plasmatiques telles que l'albumine (Menche, 2006), la transferrine, la céruloplasmine, les protéines de l'inflammation, les protéines de la coagulation et les apolipoprotéines A, B, C, E. En outre, il est le lieu principal de la dégradation des bases pyrimidiques (Poirier *et al.*, 1975).

❖ Lipides

Les lipides peuvent être stockés dans le foie sous forme de triglycérides ou décomposés en fonction des besoins produisant des acides gras libres qui subiront la β oxydation. Cette dernière conduit à l'accumulation de l'acétyl-CoA (acétyl coenzyme A) dans l'hépatocyte et génère également des corps cétoniques (Menche, 2006).

Le foie est le site de synthèse du cholestérol dont l'étape limitante est catalysée par l'enzyme 3-hydroxyl-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG CoA réductase). Ce stérol est transporté grâce aux lipoprotéines HDL (High density lipoprotein), LDL (Low density lipoprotein) et VLDL (Very low density lipoprotein) qui sont également synthétisées par le foie (Marieb, 2008).

❖ Production des acides biliaires

Les sels biliaires sont synthétisés exclusivement dans les hépatocytes lors de la dégradation du cholestérol. Ils fonctionnent comme détergent en facilitant la digestion des lipides et leur absorption par l'intestin. De nombreuses enzymes localisées dans différents compartiments sous-cellulaires d'hépatocytes interagissent dans la conversion du cholestérol en acides biliaires, dont l'enzyme limitante est la 7 α -hydroxylase (Marieb, 2008).

I.1.4.2- Stockage des minéraux et des complexes vitaminiques

En plus d'emmagasiner le glycogène, le foie stocke certaines vitamines (A, B, D, E, K) et certains minéraux (cuivre et fer):

- ❖ Environ 90 % de la vitamine A hépatique sont contenus dans les granules lipidiques des cellules stellaires sous forme d'ester de rétinol (**Rosenbaum *et al.*, 1991**).
- ❖ La vitamine E servira comme antioxydant protecteur contre les radicaux libres en protégeant les acides gras polyinsaturés de la peroxydation lipidique (**Pincemail *et al.*, 1998**).
- ❖ Le foie contient 57 % du cuivre total à la naissance et 17 % à l'âge adulte; ce cuivre se trouve lié à une protéine appelée ceruloplasmine. Il stocke aussi 20 à 30 % du fer de l'organisme sous forme liée à la ferritine dans le cytoplasme des hépatocytes et des cellules de Kupffer (**Poirier *et al.*, 1975**).

I.1.4.3- Epuration

❖ Dégradation de l'ammoniac

La dégradation des acides aminés dans les tissus périphériques produit un métabolite toxique: l'ammoniac. Celui-ci se combine au glutamate pour former la glutamine qui véhicule l'ammoniac jusqu'au foie. Cela permet l'élimination de l'ammoniac en le transformant en urée qui sera excrétée dans l'urine (**Marieb, 2008**).

❖ Métabolisme des médicaments

C'est la biotransformation des médicaments qui sont généralement des produits liposolubles en un ou plusieurs autres composés hydrosolubles actifs ou inactifs. Ceci est réalisé principalement dans le foie, au niveau du réticulum endoplasmique lisse hépatocytaire (**Poirier *et al.*, 1975**). En général, il passe par trois phases:

La phase I comprend des réactions de modifications structurelles y compris l'oxydation, la réduction et l'hydrolyse. Cette phase a pour but de convertir les médicaments en métabolites plus polaires facilement excrétés par les reins ou le système biliaire. L'oxydation des médicaments est catalysée par deux grandes familles d'enzymes, à savoir le cytochrome P450 (CYP 450: CYP3A4, 3A5, 2Cs, 1A2, 2E1, 2A6, 2D6 et CYP2B6) ainsi que les mono-oxygénases à flavine (FMO) représentés par FMO 3. Ces enzymes métabolisent

environ 90 % des médicaments. Le CYP 3A4 étant le plus important, permet le métabolisme de plus de 50 % des médicaments (Yeung *et al.*, 2014).

Les métabolites résultant de la phase I peuvent être facilement excrétés s'ils sont rendus suffisamment polaires, autrement subir des réactions de phase II impliquant la conjugaison avec des molécules endogènes fortement polaires qui augmentent la solubilité du médicament telle que l'ajout de l'acide glucuronique, les sulfates, certains acides aminés (glycine, glutamine, ornithine) ou le glutathion. Dans cette phase, il y a trois familles d'enzymes: les sulfotransférases, les UDP-glucuronosyl transférases (UGT) et les glutathion-S-transférases (GST) (Mitchell *et al.*, 2011).

La Phase III englobe des transporteurs du côté basolatéral et apical des hépatocytes tels que les transporteurs biliaire P-gp (P-glycoprotéine). Ces derniers sont des systèmes de transport actifs qui excrètent les xénobiotiques dans la bile ou le sang. Cette excrétion permet ainsi une élimination rénale, fécale ou un cycle entéro-hépatique (Mitchell *et al.*, 2011).

I.2- PARACÉTAMOL ET HÉPATOTOXICITÉ

Le paracétamol aussi dénommé acétaminophène ou 4-hydroxyacetanilide est un médicament analgésique antipyrétique indiqué dans le traitement de la fièvre et des douleurs d'intensité faible à modérée. Ce médicament est le plus vendu mondialement. Il est commercialisé seul ou en association dans de multiples spécialités pharmaceutiques telles que Doliprane®, Dafalgan® et Efferalgan® (Katzung, 2006). C'est un dérivé phénolique comportant un cycle benzénique substitué par un groupement hydroxyle et un groupement acétamide en position *para* (Figure 4). L'acétaminophène est un dérivé de la phénacétine et de l'acétanilide, possédant un faible potentiel d'interaction médicamenteuse aux doses usuelles. La dose thérapeutique du paracétamol est de 4 g/jour avec une dose efficace 50 (DE50) de 45 mg/kg/24h, alors que sa dose toxique 50 (DT50) est de 150 mg/kg/24h et sa dose létal 50 (DL50) de 2,4 g/kg (Reichl, 2004).

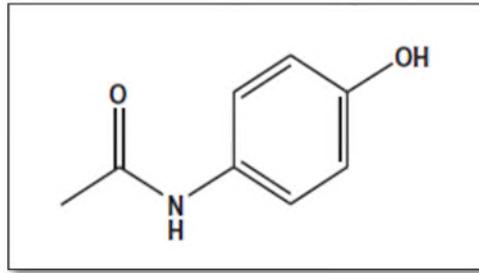


Fig. 4: La structure chimique du paracétamol (Reichl, 2004).

I.2.1 - Absorption et distribution

Comme le paracétamol a un pKa proche de 9,5, il est sous forme non ionisée, au niveau du tube digestif, ce qui facilite son absorption qui atteint 88 % pour la majorité des formes galéniques (Katzung, 2006).

Le paracétamol diffuse rapidement et très largement dans les compartiments liquidiens (sang, liquide céphalorachidien, salive) et tissus de l'organisme particulièrement dans le foie et le rein. Son volume de distribution est de 0,9 à 1,0 L/kg. Il est très faiblement lié aux protéines plasmatiques notamment l'albumine (5 à 20 %). La concentration plasmatique maximale est atteinte en 30 à 60 minutes après ingestion avec une fourchette de 10 à 20 mg/L. Son effet apparaît 20 minutes après sa prise et dure environ 4 heures avec une demi-vie d'élimination de l'ordre de 2 heures (Katzung, 2006).

I.2.2- Mode d'action

Le paracétamol agit principalement au niveau du système nerveux central en exerçant un effet antalgique et antipyrétique (Botting, 2000).

L'effet antalgique et antipyrétique provient de la métabolisation hépatique du paracétamol par désacétylation en p-aminophénol. Cette substance passe dans le sang et arrive au cerveau où elle se conjugue avec l'acide arachidonique grâce à l'hydrolase des amides d'acide gras (FAAH: Fatty acid amide hydrolase) afin de produire le N-arachidonoyl phénolamine (AM404) (Hogestatt *et al.*, 2005) (Figure 5). Ce dernier est la forme pharmacologiquement active du paracétamol car il inhibe la cyclooxygénase centrale (COX) en empêchant la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandine, un médiateur central de la douleur et de la fièvre (Botting, 2003). Aussi, le AM404 est un agoniste du récepteur TRPV1 (Transient receptor potential vanilloid 1) situé à la surface des neurones sensitifs

et impliqué dans la modulation de la douleur (Barrière *et al.*, 2010). Par ailleurs, c'est un ligand du récepteur cannabinoïde CB1 et un inhibiteur de la recapture cellulaire des endocannabinoïdes comme l'anandamide. Ces molécules endogènes sont capables de moduler le message nociceptif au niveau central via le récepteur CB1 (Hogestatt *et al.*, 2005).

Enfin, le paracétamol renforce le système sérotoninergique central conduisant à une libération de sérotonine au niveau médullaire et l'activation des récepteurs sérotoninergiques spinaux, ce qui inhibe la transmission du message douloureux (Barrière *et al.*, 2010).

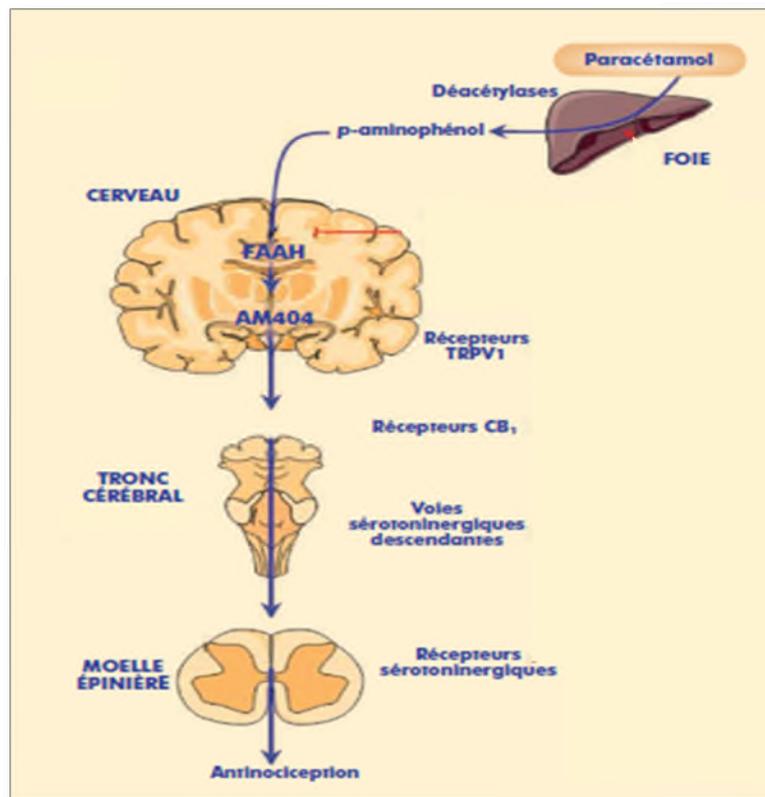


Fig. 5: Le mode d'action du paracétamol (Barrière *et al.*, 2010).

FAAH: Fatty acid amide hydrolase, AM404: N-arachidonoyl phénolamine, Récepteur CB1: récepteur cannabinoïde 1, TRPV1: Transient receptor potential vanilloïd 1.

I.2.3- Elimination

Pour être éliminé, le paracétamol est métabolisé par le foie au niveau des hépatocytes. A dose thérapeutique, une grande fraction subit des conjugaisons, à savoir la sulfo- (20-46 %) et la glucurono-conjugaison (40-67 %) sous l'action respectivement de deux sulfotransférases (SULT1A1 et SULT1A3), et de l'uridine 5'-diphospho- glucuronyltransférase (Bellier, 2011).

Une fraction minime sera oxydée via le cytochrome P450 (principalement le CYP 2E1, mais aussi les isoformes CYP 1A2 et CYP 3A4) en un intermédiaire électrophile hautement réactif et toxique: le N-acétyl p-benzoquinone-imine (NAPQI) (Figure 6). Celui-ci produit en quantité infime à dose thérapeutique, est détoxifié par conjugaison au glutathion hépatique via le glutathion-S-transférase donnant lieu à des conjugués de mercaptate, et de cystéine qui seront éliminés dans les urines (Meister et Anderson, 1983).

En cas de surdosage, une grande quantité de paracétamol sera oxydée en NAPQI alors qu'une minorité subira une conjugaison ce qui abaisse son niveau d'élimination induisant ainsi des dommages et des nécroses hépatiques centro-lobulaires (James *et al.*, 2003).

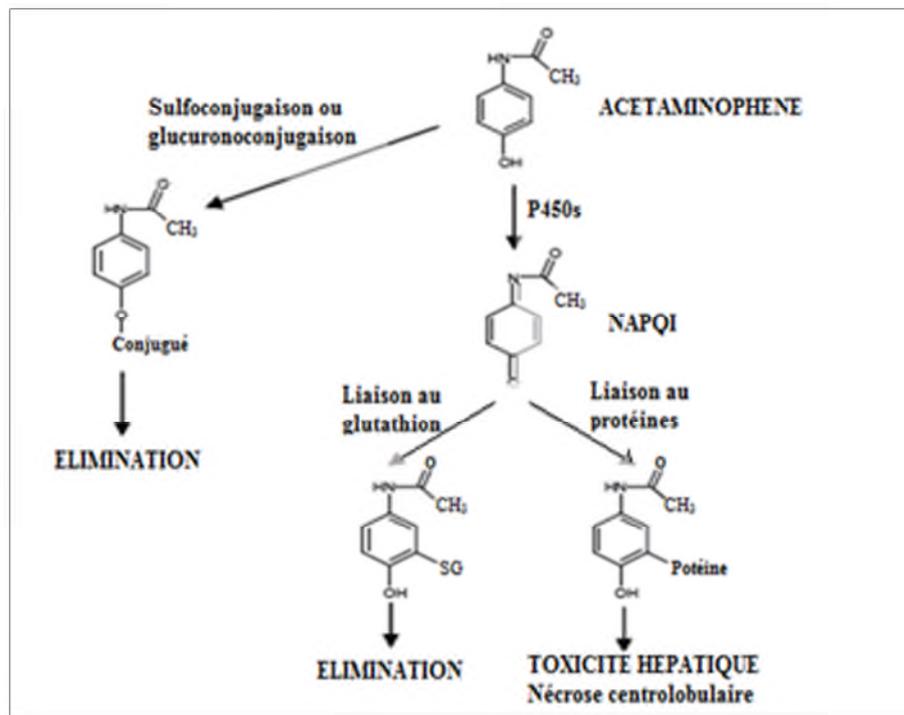


Fig. 6: Le métabolisme du paracétamol (Adapté de James *et al.*, 2003).

NAPQI: N-acétyl p-benzoquinone-imine, P450: cytochrome P450.

I.2.4- Mécanismes de l'hépatotoxicité par le paracétamol

L'expression de l'hépatotoxicité par le paracétamol est le résultat de plusieurs événements tels que la formation des adduits protéiques, la transition de la perméabilité mitochondriale, la peroxydation lipidique et l'inflammation.

I.2.4.1- Formation des adduits protéiques

A dose toxique de paracétamol, une grande quantité sera transformée en NAPQI, ce qui conduit à l'épuisement du glutathion hépatique. Cependant, le NAPQI se liera de façon covalente au groupe sulfhydryle des protéines pour former des adduits protéiques 3-(cystéine-S-yl)-acétaminophène. Ces adduits se produisent uniquement au niveau des cellules hépatiques centrolobulaires, conduisant à la perturbation des structures et fonctions des protéines hépatiques (Reid *et al.*, 2005). Ainsi, le NAPQI induira un déséquilibre de l'homéostasie calcique par inhibition de la pompe $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase, ce qui est à l'origine de l'augmentation des niveaux cytosoliques de Ca^{2+} qui mènent à l'activation des protéases intracellulaires dépendantes de Ca^{2+} comme les calpaïnes. Ces enzymes peuvent cliver des protéines de structure à l'intérieur de la cellule et contribuer à la nécrose. Une autre conséquence de la perturbation intracellulaire de l'homéostasie de Ca^{2+} est l'accumulation de Ca^{2+} dans le noyau et l'activation d'une endonucléase $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dépendante (DNAS1L3) responsable de la fragmentation de l'ADN (Figure 7) (Jaeschke et Bajt, 2006).

La toxicité par l'acétaminophène s'accompagne aussi par la formation d'adduits protéiques de nitrotyrosine (3-nitrotyrosine) formés par nitration de la tyrosine par le peroxyde d'azote (ONOO⁻), une espèce hautement réactive favorisant le stress oxydant et générée à partir du superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et de l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}) (James *et al.*, 2003) (Figure 7). Les adduits de nitrotyrosine se co-localisent avec les adduits protéiques d'acétaminophène au niveau des domaines centrolobulaires du foie et représentent des biomarqueurs de la toxicité par le paracétamol (Reid *et al.*, 2005).

I.2.4.2- Transition de la perméabilité mitochondriale

La transition de la perméabilité mitochondriale (MPT) est un autre phénomène de l'hépatotoxicité par le paracétamol. Il a été montré que les oxydants tels que les peroxydes et peroxyde d'azote ainsi que le Ca^{2+} favorisent la MPT. Cette dernière est caractérisée par un changement de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne, la formation de pores dénommés PTPM (pores de transition de la perméabilité mitochondriale) et le découplage de la phosphorylation oxydative favorisant ainsi la diminution du potentiel membranaire et de la synthèse d'ATP (Reid *et al.*, 2005; Hinson *et al.*, 2010).

En outre, le membre pro-apoptotique Bax (Bcl-2 associated X protein) de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) réside dans le cytosol, mais il peut transloquer vers la mitochondrie et former des pores dans la membrane mitochondriale externe, seul ou en combinaison avec

d'autres protéines Bcl-2, par exemple Bad (Bcl-XL/bcl-2 associated death promoter homolog) et Bid (BH3 interacting death domain agonist). La formation de ces pores, conjointement avec ceux du MPT, conduit à la libération des protéines à partir de l'espace inter-membranaire tel que les endonucléases G, le facteur d'induction d'apoptose (AIF), le second activateur de mitochondries dérivé des caspases (Smac) et le cytochrome c. L'AIF et l'endonucléase G transloquent vers le noyau et engendrent la condensation de la chromatine ainsi que la fragmentation de l'ADN nucléaire, respectivement, ce qui est en corrélation avec la nécrose hépatique (Figure 7) (Jaeschke et Bajt, 2006).

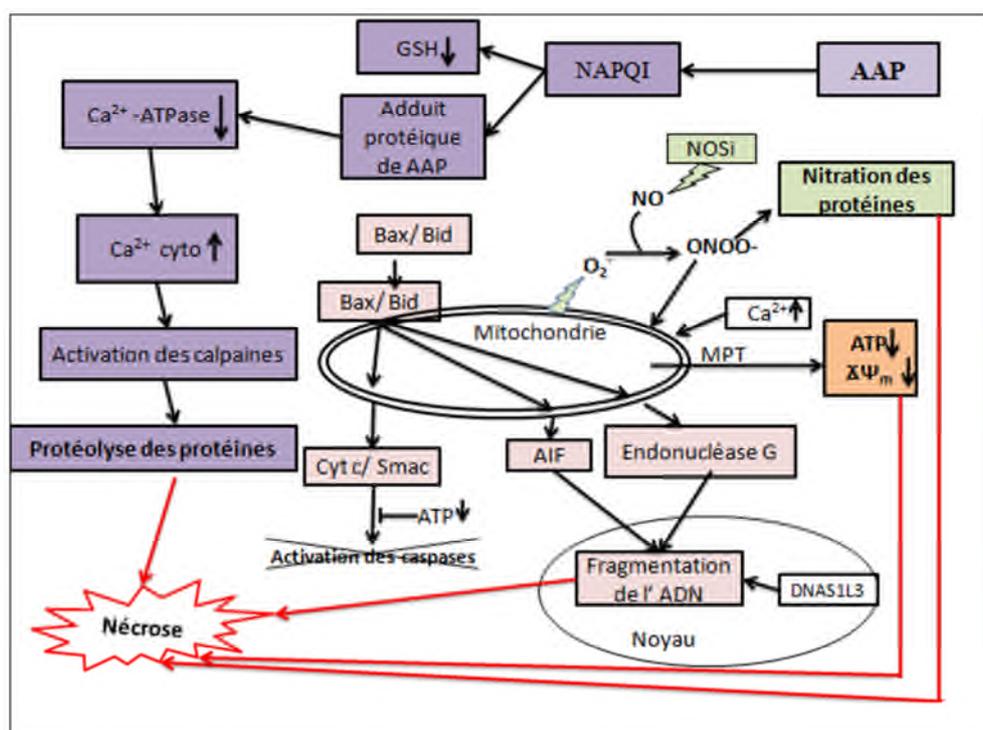


Fig. 7: Les mécanismes de l'hépatotoxicité par le paracétamol (Adapté de Jaeschke et Bajt, 2006).

AAP: Acétaminophène, NAPQI: N-acétyl p-benzoquinone-imine, GSH: Glutathion réduit, Ca^{2+} cyto: Calcium cytosolique, Ca^{2+} -ATPase: Pompe calcium, Bax: Bcl-2 associated X protein, Bid: BH₃ interacting death domain agonist, Cyt c: Cytochrome c, Smac: Second mitochondrial activator of caspase, ATP: Adénosine triphosphate, AIF: Facteur d'induction d'apoptose, DNAS1L3: Endonucléase $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dépendante; ADN: Acide désoxyribonucléique; MPT: Transition de la perméabilité mitochondriale, $\Delta\Psi_m$: Potentiel membranaire, O_2^- : Superoxyde, NO: Oxyde nitrique, ONOO⁻: Peroxynitrite, NOSi: Oxyde nitrique synthase inductible.

I.2.4.4- Peroxydation lipidique

Lors de l'intoxication par le paracétamol, le glutathion est en pénurie à cause de l'excès de NAPQI. Ainsi, la glutathion peroxydase qui nécessite le GSH comme cofacteur ne sera plus fonctionnelle et ne pourra plus détoxifier le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé à partir du super oxyde (O_2^-). Cependant, le H_2O_2 s'accumule, ce qui augmentera le stress

oxydant via la réaction de Fenton qui génèrera le radical hydroxyle (OH^\bullet) (Hinson, 2010). Ce dernier oxyde un acide gras polyinsaturé (LH), formant un radical lipidique (L^\bullet) qui réagit avec une molécule de dioxygène pour produire un radical peroxyde (LOO^\bullet). Celui-ci attaque un autre acide gras polyinsaturé pour former un produit primaire: l'hydroperoxyde (LOOH) qui, sous l'action des métaux (Fe^{2+}), formera des radicaux alkoxydes (LO^\bullet) et hydroxyles (HO^\bullet) (Figure 8). Enfin, des phases terminales de dégradation conduiront à des aldéhydes, parmi eux le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE). Ces produits terminaux peuvent être mesurés dans le plasma en tant que biomarqueurs du stress oxydant (Michel *et al.*, 2008).

Comme conséquence, la peroxydation lipidique peut créer des altérations de la membrane telles que la modification de sa fluidité, mais aussi l'inactivation de récepteurs, d'enzymes et de la voie de transduction des signaux (Favier, 2003). Par exemple, l'excès des aldéhydes réactifs (MDA et 4-HNE) entraîne leur combinaison aux groupements aminés libres des protéines (essentiellement les résidus lysines) conduisant à la formation de produits d'addition susceptibles d'altérer les propriétés biologiques des protéines concernées. En outre, les protéines modifiées par le MDA sont immunogènes et peuvent conduire à la formation d'anticorps dirigés en particulier contre les résidus lysines modifiés par le MDA (Michel *et al.*, 2008). De plus, le MDA forme des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine induisant ainsi des mutations et des lésions dans le matériel génétique pouvant mener à la mort cellulaire (Favier, 2003).

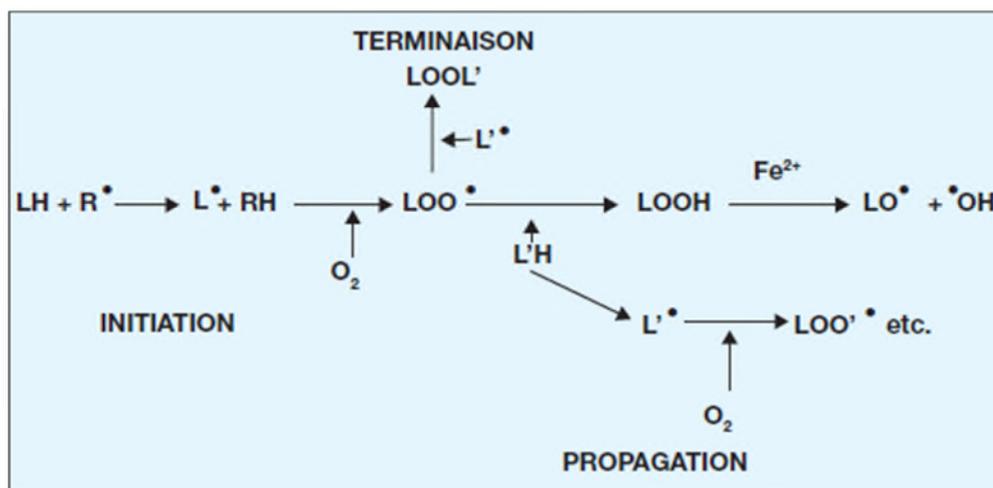


Fig. 8: Les étapes de la peroxydation lipidique (Michel *et al.*, 2008).

LH: acide gras polyinsaturé, R^\bullet : radical initiateur tel que le OH^\bullet , L^\bullet : radical lipidique, RH: acide gras polyinsaturé, O_2 : dioxygène, LOO^\bullet : radical peroxyde, LOOL' : produit stable, LOOH : hydroperoxyde, LO^\bullet : radical alkoxyde, HO^\bullet : radical hydroxyle, Fe^{2+} : Fer ferreux.

I.2.4.3- Inflammation

Un surdosage de paracétamol conduit à l'activation des cellules de Kupffer qui produisent des molécules pro-inflammatoires telles que TNF α (Tumor necrosis factor α). Cette dernière se fixe sur son récepteur membranaire TNF α -R menant à l'activation de la voie NF κ B (Nuclear Factor for the κ chain of B cells). Le NF κ B est séquestré en l'absence d'activation dans le cytoplasme en s'associant à des protéines inhibitrices de NF κ B (I κ B). I κ B kinase (IKK) phosphoryle et dégrade I κ B (Inhibitor of NF κ B), ce qui entraîne la libération de NF κ B qui pénètre dans le noyau, se fixe sur l'élément de réponse à NF κ B (NF κ B RE) et active les gènes codants pour maintes molécules telles que les cytokines, NOSi (Oxyde nitrique synthase inductible) et COX (Figure 9) (Kim *et al.*, 2010).

La cyclooxygénase 1/2 transforme l'acide arachidonique en prostaglandine H₂. Cette dernière est métabolisée par la thromboxane synthase en thromboxane A₂ qui se transformera en 12-HHT (12 (*S*)-hydroxyheptadeca-5*Z*, 8*E*, 10*E*-trienoic acid) et en MDA (Willis et Smith, 1994). Ce dernier amplifiera la réponse inflammatoire en activant la voie NF κ B (Strain et Diehl, 2012).

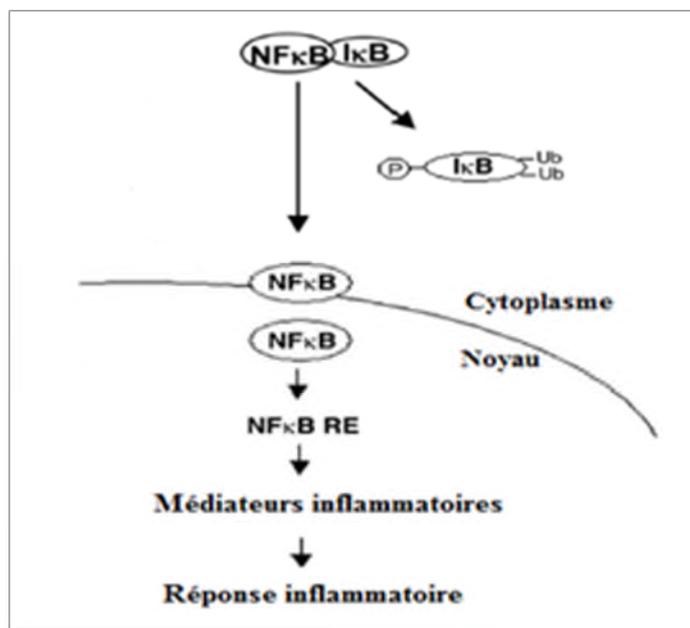


Fig. 9: La voie NF κ B (Adapté de Kim *et al.*, 2010).

NF κ B: Nuclear Factor for the κ chain of B cells, I κ B: Inhibitor of NF κ B, NF κ B RE: Elément de réponse à NF κ B.

I.3- Systèmes de défense

Pour faire face à l'hépatotoxicité induite par le paracétamol, la cellule développe des systèmes de défense d'origine endogène ou de provenance exogène: ce sont les antioxydants. Ces antioxydants sont des substances susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène (Favier, 2003).

I.3.1- Molécules endogènes enzymatiques

Elles comprennent les enzymes de la phase II et celles de la détoxification telles que: la glutathion-S-transférase, la quinone oxydoréductase-1, la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase. La SOD est capable d'éliminer l' O_2^- par une réaction de dismutation en générant le H_2O_2 . Ce dernier est converti par la catalase et la glutathion peroxydase en H_2O . La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du glutathion disulfure (GSSG) grâce au NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) produit par la glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PD) (Kim *et al.*, 2010) (Figure 10).

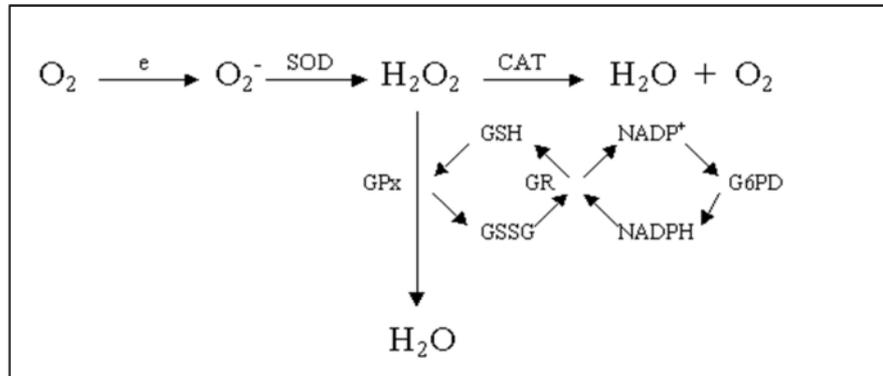


Fig. 10: Le mode d'action de quelques enzymes antioxydantes (Inspiré de Favier *et al.*, 2003).

O_2 : Oxygène, O_2^- : Superoxyde, H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène, H_2O : Eau, SOD: Superoxyde dismutase, CAT: Catalase, GPx: Glutathion peroxydase, GR: Glutathion réductase, GSH: Glutathion réduit, GSSG: Glutathion disulfure, NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, $NADP^+$: Forme oxydé de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, G6PD: glucose 6 phosphate déshydrogénase.

I.3.2- Molécules endogènes non enzymatiques

Le glutathion est la principale molécule endogène non enzymatique. C'est un tripeptide constitué par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (γ -L-Glutamyl-L-cystéinylglycine) par la c-glutamyl-cystéine synthétase. Il existe sous forme

de glutathion réduit (GSH), disulfure (GSSG) et nitro-glutathion (GSNO). Il a un rôle crucial dans la protection contre le stress oxydant car il neutralise les radicaux libres et contribue à la régénération des molécules anti-oxydantes telles que l'acide ascorbique et l' α -tocophérol (Rahman et Macnee, 2000).

I.3.3- Molécules de défense exogène

I.3.3.1- Vitamines

L' α -tocophérol (vitamine E) est le principal antioxydant liposoluble. Cette vitamine se fixe aux membranes et empêche la propagation de la peroxydation lipidique comme elle est capable de piéger l'oxygène singulet et le radical hydroxyle (Pincemail *et al.*, 1998). Cette vitamine est régénérée par une vitamine hydrosoluble qui est l'acide ascorbique (vitamine C). Cette dernière se réduit par les ascorbates réductases ou le glutathion (Favier, 2003) (Figure 11).

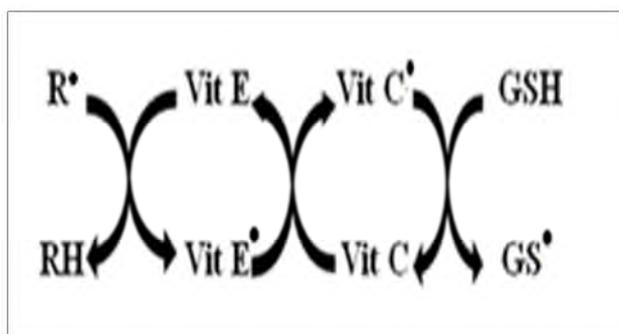


Fig. 11: Le recyclage de la vitamine E et C (Pincemail *et al.*, 1998).

R•: Radical lipidique, RH: acide gras polyinsaturé, Vit E: Vitamine E, Vit E•: vitamine E réduite, Vit C: Vitamine C, Vit C•: vitamine C réduite, GSH: glutathion réduit, GS•: radical de glutathion.

I.3.3.2- Métabolites secondaires

Les plantes médicinales possèdent plusieurs principes actifs qui permettent leur croissance et leur défense contre les agents étrangers. Ces principes sont appelés métabolites secondaires, parmi eux:

❖ Polyphénols

Ils regroupent plus de 8 000 molécules divisées en une dizaine de classes chimiques, ayant toutes un point commun: la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Ces polyphénols sont synthétisés principalement par deux grandes voies d'aromagenèse: la voie de l'acide shikimique et la voie polyacétate. Mais la participation

d'un troisième composé -le mévalonate- est également possible bien que moins fréquent (**Bruneton, 1999**). Les polyphénols sont représentés majoritairement par les flavonoïdes (quercétine). Ainsi, il existe d'autres polyphénols tels que les acides phénoliques (acide caféique), les coumarines (ombéliférone), les tanins (gallotanins), et les quinones (benzoquinone) (**Hennebelle et al., 2004**).

Les composés phénoliques possèdent plusieurs activités biologiques telles que: antioxydants, hépatoprotecteurs, anti-inflammatoires, diurétiques (**Hennebelle et al., 2004**), antiallergiques, anti-cancérogènes, antimutagènes et anti-tumorales (**Bruneton, 2009**).

❖ Terpènes

Les terpènes sont des métabolites secondaires qui se forment par l'assemblage d'unités penta-carbonées ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène. Ces unités sont synthétisées principalement par la voie mévalonate et chaque classe des terpènes est issue généralement de la condensation « tête-à-queue » d'un nombre variable d'unités isopréniques, ce qui permet de classer les terpènes selon le nombre de carbones: les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les sesterterpènes, les triterpènes, les tétraterpènes et les polyisoprènes (**Bruneton, 1999**).

Parmi les activités biologiques des terpènes: antioxydants, antiseptiques, spasmolytiques, cicatrisants, cholérétiques, anti-inflammatoires, anticoagulants, antihypertensives, cardiotoniques et analgésiques (**Bruneton, 2009**).

❖ Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances naturelles azotées, réagissant comme des bases; ils ont des structures complexes par lesquelles on désigne 3 groupes: les vrais alcaloïdes, les proto-alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes. Parmi les activités biologiques des alcaloïdes: dépresseurs et stimulants du système nerveux, antioxydants, anticholinergiques, effets anesthésiques locaux, anti-fibrilles et anti-tumoraux (**Bruneton, 1999**).

❖ Mode d'action de quelques métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ont un puissant effet antioxydant, cet effet peut être dû à l'interaction de ces métabolites avec les molécules endogènes intervenant dans le mécanisme de la réponse cellulaire au stress oxydant. Plusieurs recherches ont été réalisées afin d'élucider, identifier et comprendre le mode d'action de ses métabolites.

D'après Heim et ses collaborateurs (2002), Il y a plus de 25 ans de recherches pour identifier la relation entre l'activité antioxydante des flavonoïdes et leurs structures *in vitro*.

Parmi les caractéristiques qui augmentent la corrélation entre leurs structures et cette activité:

- Le degré élevé d'hydroxylation, la position et l'arrangement des groupements OH spécialement dans le cycle B (Figure 12).
- La présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison à la fonction 4-carbonyl.
- Le degré de polymérisation des flavonoïdes influence aussi sur l'activité antioxydant. Les composés flavonoïdiques en forme hexamérique ont une plus grande capacité à piéger le ONOO^- et le O_2^- que les composés tétramériques.

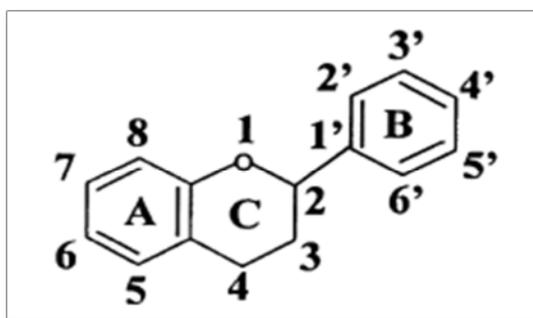


Fig. 12: La structure des flavonoïdes (Heim *et al.*, 2002).

Concernant le mode d'action, certains polyphénols peuvent réguler les mécanismes de défense de la cellule à travers l'activation du facteur Nrf 2 (Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2). Ce facteur joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie lors du stress oxydatif car il permet la transcription de plusieurs gènes cytoprotecteurs tels que les enzymes antioxydantes. Dans l'état normal, le Nrf 2 est séquestré dans le cytoplasme en état inactif par son répresseur Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) (Figure 13). Les modifications de ce dernier par l'oxydation de ses groupements thiol et/ou la phosphorylation de ses résidus sérines et thréonines par la MAPK (Mitogen activated protein kinase) conduisent à la libération du facteur Nrf 2. Ce dernier transloque vers le noyau où il se lie à l'élément de réponse aux antioxydants (ARE). Cette liaison conduit à la transcription des gènes codants pour les molécules antioxydantes et les enzymes de détoxification (Kim *et al.*, 2010).

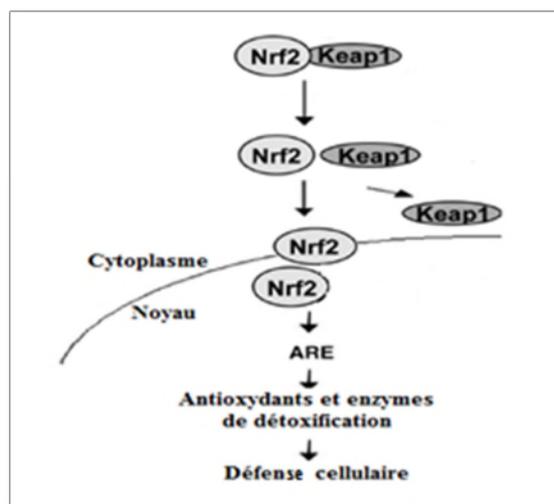


Fig. 13: La voie Nrf 2/Keap1 (Adapté de Kim *et al.*, 2010).

Nrf 2: Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2, Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1, ARE: Elément de réponse aux antioxydants.

L'étude de Chen et ses collaborateurs (2009) a montré que les polyphénols du thé ont réduit de manière significative et dose dépendante les niveaux de CYP450 dans le foie de la souris; ainsi ils peuvent diminuer l'hépatotoxicité en empêchant la transformation du paracétamol en son métabolite toxique.

L'étude de Lee et ses collaborateurs (2010) a montré que l'ester phénéthylque de l'acide caféique (EPAC) a inhibé le complexe IKK responsable de l'activation de la voie NFκB. L'inhibition de cette voie empêche la libération des cytokines et l'expression de NOSi, producteur de NO, ce qui diminue la réponse inflammatoire et immunitaire. La même étude a révélé qu'EPAC a augmenté la transcription des enzymes anti-oxydantes par l'intervention de son groupement catéchol. Ce dernier génère des quinones qui réagissent avec le groupement sulfhydryle de Keap1 conduisant à l'activation de Nrf 2.

Yu et ses collaborateurs (1999) ont étudié le rôle du butylhydroquinone tertiaire (BHQT) et de sulforaphane (SUL) dans l'activation de la voie MAPK qui induit l'expression des enzymes de la phase II de détoxification. Ces molécules interagissent directement avec Raf 1 (Rapidly accelerated fibrosarcoma 1) conduisant à l'activation de l'ERK 2 (Extra cellular signal-regulated kinase 2). Cette activation permet la phosphorylation de plusieurs protéines cytosoliques et nucléaires telles que Elk 1 (Ets-like transcription factor 1) qui interfère avec c-fos (c-FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog) et active AP-1 (Activator protein 1) permettant sa liaison à ARE et activant ainsi l'expression

des enzymes de détoxification (Figure 14). Aussi, l'ERK 2 peut intervenir pour la phosphorylation de Keap1 entraînant la libération de Nrf 2.

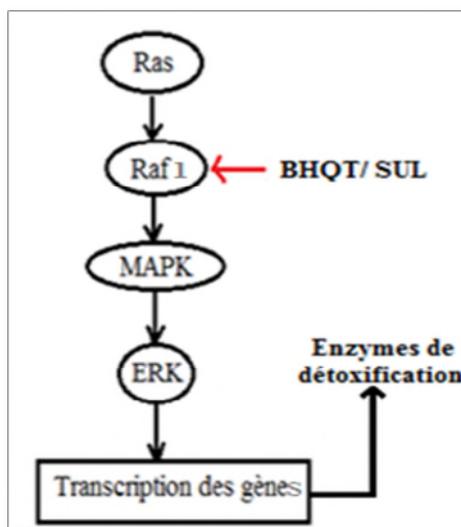


Fig.14: La voie ERK/MAPK (Inspiré de Yu *et al.*, 1999).

Ras: Rat sarcoma, Raf 1: Rapidly accelerated fibrosarcoma 1, MAPK: Mitogen activated protein kinase. ERK: Extra cellular signal-regulated kinase.

I.4- *POPULUS NIGRA*

Populus nigra (*P. nigra*) a été sélectionnée pour étudier l'effet hépatoprotecteur de ses bourgeons contre l'intoxication par le paracétamol (Figure 15). C'est une plante largement utilisée en médecine traditionnelle. Elle est communément appelée peuplier noir, peuplier franc ou peuplier commun (Fournier, 2010) et localement appelée Safçaf en arabe et Asafçaf en berbère (Beloued, 2001).

I.4.1- Description

C'est un arbre à feuilles tremblantes pouvant atteindre 20 à 40 m de hauteur (Fournier, 2010) et 2 m de circonférence, à écorce en gerçures et rameaux visqueux; les bourgeons sont allongés et pointus, les feuilles deltoïdes ou ovales triangulaires, dentées, alternes et longuement pétiolées avec une couleur verte et luisantes (Beloued, 2001).

Le peuplier commun n'est spontané que dans une partie de l'Europe, l'ouest de l'Asie et le Nord de l'Afrique (Fournier, 2010). En Algérie, on le retrouve à El kala, Tlemcen et la Kabylie, dans les rives des cours d'eau douce, surtout en montagnes (Beloued, 2001).

I.4.2- Classification

La classification taxonomique de *Populus nigra* est comme suit (Beloued, 2001) :

Règne	Végétale
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Salicales
Famille	Salicacées
Genre	<i>Populus</i>
Espèce	<i>Populus nigra</i>



Fig. 15: L'arbre de *Populus nigra* (Photographie)

I.4.3- Usage traditionnelle

Les bourgeons à fleurs de *P. nigra* constituent la partie la plus utilisée en phytothérapie. Ils sont recommandés dans les affections des reins et de la vessie, contre les catarrhes des voies respiratoires, les bronchites, les fièvres intermittentes, les rhumatismes, les hémorroïdes, la goutte et la sciatique (Fournier, 2010).

I.4.4- Etudes antérieures sur *Populus nigra*

Dans le but de valider son utilisation traditionnelle, quelques études ont été conduites sur cette plante. Warnant et ses collaborateurs (2004) ont montré ses propriétés anti-oxydantes en utilisant un modèle de peroxydation de l'acide linoléique induite par le fer. Par ailleurs, Rohnert et ses collègues (1998) ont montré que l'oxydation des LDL induite par le Cu^{2+} a été fortement inhibée par différents extraits aqueux d'une drogue composée de Fraxinus-Dolidago-Populus.

L'activité anti-inflammatoire des extraits de plusieurs espèces de *Populus* a été déjà rapportée en utilisant un modèle impliquant la xanthine oxydase (Karawya *et al.*, 2010). En outre, l'activité anti-bactérienne et anti-fongique des extraits de *P. nigra* a été évaluée et les résultats ont révélé que ses feuilles ont fortement inhibé l'activité de plusieurs souches bactériennes pathogènes (Vardar-Ünlü *et al.*, 2008; Al-Hussaini et Mahasneh, 2009).

L'extrait éthanolique de *P. nigra* a inhibé la formation de l'œdème induit par la carragénine chez la souris (Karawya *et al.*, 2010; Debbache *et al.*, 2013), alors que l'extrait aqueux a régulé les gènes impliqués dans la défense anti-oxydante et la réponse anti-inflammatoire (Dudonné *et al.*, 2011). Aussi, le même extrait était efficace contre plusieurs radicaux libres (Debbache *et al.*, 2014). Une autre étude, établie par Debbache et ses collaborateurs (2013) a montré que l'extrait éthanolique de bourgeons de *P. nigra* a exercé une hépatoprotection contre l'aluminium avec un effet relaxant au niveau de l'artère coronaire porcine.

Ces activités sont essentiellement dues à leur composition en métabolites secondaires. Quelques études se sont intéressées à la séparation et l'identification des composés actifs présents dans les bourgeons de *P. nigra*. Parmi ces études, celles établies par Greenway et ses collaborateurs (1988 ; 1990) où ils ont identifié les composés présents majoritairement dans les bourgeonnements de *P. nigra* qui sont l'acide caféique (Figure 16a), l'acide isoferulique et leurs esters, ainsi que les flavonoides et les chalcones avec des taux faibles de dihydrochalcone, de l'acide cinnamique, de l'acide coumarique et leurs esters. Comme ils ont remarqué l'absence des composés terpéniques (Greenaway *et al.*, 1990). Alors que les travaux de Jerković et Mastelić (2003) ont désigné environ 48 molécules volatiles dans les bourgeons de *P. nigra* qui présentent 95 % de composés volatiles dont les monoterpènes, les hemiterpènes et les sesquiterpènes, alors que les 5 % restants sont des composés volatiles non-terpéniques tels que les alcools aliphatiques et aromatiques.

Les bourgeons possèdent aussi d'autres métabolites secondaires tels que la quercétine (Palo, 1983) (Figure 16b), le salicylate (Rubiolo *et al.*, 2013; Dudonné *et al.*, 2011) (Figure 16c) et le benzoylosalicoside (Beloued, 2001). Comme ils contiennent des résines, des acides galliques et maliques, des matières grasses et de la populine (Fournier, 2010).

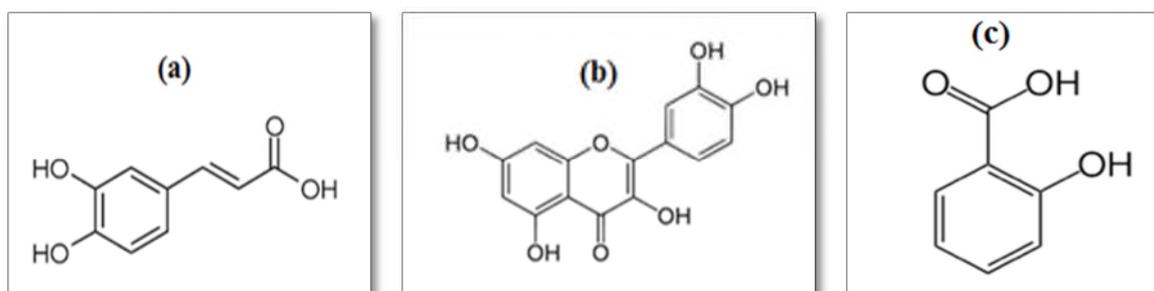


Fig. 16: La structure chimique de quelques composés de *Populus nigra* (Bruneton, 2009).

(a)Acide caféique; (b) Quercétine; (c) Salicylate.

Matériels

Et

Méthodes

II. 1- MATERIELS**II.1.1- Matériel végétal**

Les bourgeons de *P. nigra* (Figure 17) ont été utilisés comme source de phytochimiques.



Fig. 17: Les bourgeons de *Populus nigra* (Photographie).

II.1.2- Matériel animal et conditions d'élevage

Pour évaluer l'effet hépatoprotecteur de l'extrait brut de bourgeons de *P. nigra* contre une intoxication au paracétamol, des souris albinos NMRI (Naval Medical Research Institute) mâles et femelles, ayant un poids qui varie entre 22-30 g avec une moyenne d'âge (6 ± 2) semaines ont été utilisées.

Ces animaux proviennent du centre d'élevage de l'institut Pasteur d'Alger et l'expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire d'expérimentation animale de l'université Abderrahmane MIRA de Béjaia.

Pour respecter leur cycle biologique, les animaux ont été mis sous des conditions de température ambiante de (25 ± 2) °C et d'humidité de 60-70 % avec un cycle 12/12h (lumière/obscurité). Les souris ont été nourries à volonté avec l'aliment à bouchon et l'eau de robinet.

II.1.3 - Appareillages et produits chimiques

Plusieurs appareils et produits chimiques ont été utilisés pour la réalisation de ce travail. Le tableau suivant les résume, (Tableau I).

Tableau I: Les différents appareils et produits chimiques utilisés

Appareillages	Produits chimiques
<ul style="list-style-type: none"> - Agitateur (VELP) - Balance (RADWAG) - Sonde de gavage - Sonicateur (RAYPA) - Vortex (VELP) - Etuve (BINDER) - Centrifugeuse (SIGMA) - Spectrophotomètres (SHIMADZU) et (PICTUS B DIATRON) - Bain marie (MEMMERT) - Microscope optique avec appareil photo intégré (OPTICA) - Automate d'inclusion (LEICA) - Appareil d'enrobage dans la paraffine (SLEE) - Microtome (LEICA) - Broyeur électrique (HEIDOLPH) et (KIKA) - Tamiseur de marque (RETSCH) 	<ul style="list-style-type: none"> - CMC - Formol (10%) - Silymarine - Paracétamol (Efferalgon 500g) - Réactif de Brad ford ; BSA - SDS ; acide acétique ; NaOH ; TBA - Eau physiologique ; Eau distillé - 1-butanol ; pyridine ; KCl ; EDTA - Kits de dosage des transaminases (SPINREACT) - Eosine - Hématoxyline de HARRIS - Xylène - Paraffine - Ethanol - Eukitt - Chloroforme

II. 2- METHODES

II.2.1- Préparation de l'extrait

❖ **Récolte**

Les bourgeons du peuplier noir ont été récoltés en mois de Mars dans la forêt d'Azru n' Bechar, à Amizour - Béjaia -.

❖ Séchage

Ces bourgeons ont été séchés à l'étuve (37°C) afin d'éliminer toute trace d'humidité.

❖ Broyage

A l'aide d'un broyeur électrique de marque KIKA, les bourgeons de *P. nigra* ont été broyés afin d'obtenir une poudre fine.

❖ Tamisage

La poudre obtenue a été tamisée à l'aide d'un tamiseur de marque RETSCH pour récupérer une poudre très fine d'un diamètre de 63µm. La poudre a été préservée dans des flacons, en verre, fermés et stockés à l'abri de la lumière et de l'humidité.

❖ Extraction

La méthode d'extraction est une méthode d'extraction solide/liquide en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction :

1. 600 g de poudre de bourgeons de *P. nigra* ont été macérés dans de l'éthanol à 96 % avec un rapport de 1:6 (P/V).
2. Le mélange a été laissé sous agitation durant 24h, puis transféré dans une éprouvette pour décantation pendant 24h.
3. Le surnageant récupéré a été centrifugé à 3000 g/10 minutes puis transféré dans un cristalliseur et laissé séché à l'étuve et à l'abri de la lumière jusqu'à évaporation totale du solvant.
4. L'extrait sec a été conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

II.2.2- Evaluation de l'effet hépatoprotecteur contre l'intoxication par le paracétamol**II.2.2.1- Principe**

Pour mettre en évidence l'activité hépatoprotective de l'extrait éthanolique de bourgeons de *P. nigra*, un modèle expérimental d'hépatotoxicité induite par le paracétamol a été sélectionné.

II.2.2.2- Protocole expérimental

La technique utilisée a été inspirée de la méthode décrite par Kanbur et al. (2009) et Forouzandeh et al. (2013).

Un effectif de 70 souris a été utilisé pour ce protocole. Ces souris ont été réparties en 7 groupes de 10 chacun.

Les extraits brut de *P. nigra* (100 et 300 mg/Kg) ainsi que le véhicule carboxyméthyl cellulose (CMC à 0,8 %) et le standard (silymarine à 100 mg/Kg) ont été administrés aux souris par voie intra-gastrique (IG), à l'aide d'une sonde gastro-œsophagienne alors que la voie intra-péritonéale (IP), a été adoptée pour le paracétamol (400 mg/Kg).

La nourriture a été enlevée aux souris une heure avant chaque gavage et leur a été remise une heure après. Le tableau suivant montre la répartition des groupes et les différents traitements, (Tableau II).

Tableau II: La répartition des groupes et les différents traitements

Groupes	IG	IP
Véhicule	CMC	Eau physiologique
Contrôle 100 mg/Kg	Extrait 100 mg/Kg	Eau physiologique
Contrôle 300 mg/Kg	Extrait 300 mg/Kg	Eau physiologique
PCM	CMC	PCM 400 mg/Kg
Test 100 mg/Kg	Extrait 100 mg/Kg	PCM 400 mg/Kg
Test 300 mg/Kg	Extrait 300 mg/Kg	PCM 400 mg/Kg
Standard	Silymarine 100 mg/Kg	PCM 400 mg/Kg

IG: intragastrique, IP: intra-péritonéale, CMC: carboxyméthyl cellulose, PCM: paracétamol.

L'effet préventif de l'extrait contre une hépatotoxicité induite par le paracétamol a été évalué après administration de l'extrait brut de *P. nigra* pendant 5 jours. Au 5^{ème} jour, le paracétamol a été injecté 1h après administration de la dernière dose de l'extrait. 24 h après, les souris ont été sacrifiées par décapitation sous légère anesthésie à la vapeur de chloroforme, cela après un jeûne nocturne.

Le sang a été récolté à partir de la jugulaire pour le dosage des paramètres hépatiques dont les transaminases. Le foie a été récupéré après dissection, homogénéisé et utilisé pour la

réalisation du test de la peroxydation lipidique. Quelques échantillons de foie ont été conservés dans du formol à 10 % pour l'étude histologique.

II.2.2.3 - Dosage sanguin des transaminases

Le dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) a été réalisé au niveau des établissements publics de santé de proximité (EPSP) de Sidi Ahmed et Ihaddaden - Béjaia, par la méthode du dosage enzymatique couplé selon la fiche technique du Kit SPINREACT (Espagne). La concentration de ces enzymes est exprimée en unité internationale par litre de substrat (UI/L). 1UI correspond à la quantité d'enzymes qui transforment 1 μ mol de substrat/min.

❖ Principe

- Aspartate aminotransférase (ASAT)

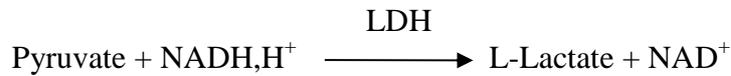
L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi le glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) catalyse le transfert d'un groupe aminé à partir de l'aspartate à l' α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. Ce dernier est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH,H⁺ (Nicotinamide adénine dinucléotide) selon les réactions suivantes:



Le taux de diminution de la concentration en NADH,H⁺ mesuré par spectrophotométrie à 340 nm, est proportionnel à l'activité catalytique de ASAT (Davila *et al.*, 1989).

- Alanine amino transférase (ALAT)

L'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi le glutamate-pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert d'un groupe aminé à partir de l'alanine à l' α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Ce dernier est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH,H⁺ selon les réactions suivantes:



Le taux de la diminution de la concentration en NADH,H^+ mesuré par spectrophotométrie à 340 nm, est proportionnel à l'activité catalytique de ALAT (Davila *et al.*, 1989).

❖ Mode opératoire

La récolte du sang a été faite dans des tubes héparinés. Ces derniers ont été soumis à une centrifugation à 4000 g/5 min. Le sérum a été ensuite récupéré et utilisé pour le dosage des transaminases (ASAT et ALAT) grâce à des kits enzymatiques SPINREACT en utilisant 1000 μl du réactif pour 100 μl du sérum et cela pour chaque test et pour chaque échantillon. Après agitation, l'absorbance à 340 nm a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre de marque Pictus B Diatron.

II.2.2.4- Préparation des homogénats du foie

Après le sacrifice et la dissection, le foie des souris a été récupéré dans de l'eau physiologique puis pesé grâce à une balance. 1 g du foie a été broyé dans 10 ml du tampon KCl-EDTA (0,15 M à pH 7,4) ou KCl (1,15 % pH 7,4) à l'aide d'un mortier en porcelaine puis homogénéisé dans un homogénéisateur de marque HEIDOLPH. L'homogénat obtenu a été soumis à une centrifugation de 10000 g /20 min à 4°C (Olaleye *et al.*, 2014). Le surnageant a été ensuite récupéré et mis dans des eppendorf qui ont été conservés à -80 °C jusqu'à usage ultérieur.

II-2.2.5- Dosage des protéines dans les homogénats du foie

La quantité des protéines dans l'homogénat a été mesurée par spectrophotométrie selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant une protéine standard BSA (Bovine Serum Albumine).

❖ Principe

La méthode de Bradford est une méthode d'analyse spectroscopique utilisée pour mesurer la concentration des protéines en solution avec une précision de l'ordre du microgramme. Elle utilise le réactif du bleu de Coomassie dont la couleur verdâtre est convertie en bleu (Figure 27) caractéristique du complexe formé entre ce réactif et les acides aminés basiques (Arginine, histidine, lysine) et aromatiques présents dans l'échantillon. A l'état libre, ce colorant absorbe à 465 nm alors qu'après complexation, son absorbance est de 595 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

❖ Mode opératoire

A 5 ml du réactif de Bradford, il a été rajouté 90 µl d'eau distillée et 10 µl d'homogénat. Après agitation suivie d'une incubation pendant 10 minutes, l'absorbance a été mesurée à 595 nm. Les absorbances obtenues ont été converties en concentration grâce à une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la BSA comme protéine de référence (Annexe 1).

II-2.2.6- Dosage hépatique du malondialdéhyde**❖ Principe**

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux de la peroxydation lipidique formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés par les radicaux libres. La détermination de la concentration de MDA est réalisée par la réaction de celui-ci avec deux molécules de l'acide thio-barbiturique (TBA) en milieu acide et à une haute température. Cette réaction forme un complexe de couleur rose extractible par les solvants organiques, comme le n-butanol, et qui absorbe à 532 nm (Figure 18) (Lefèvre *et al.*, 1998).

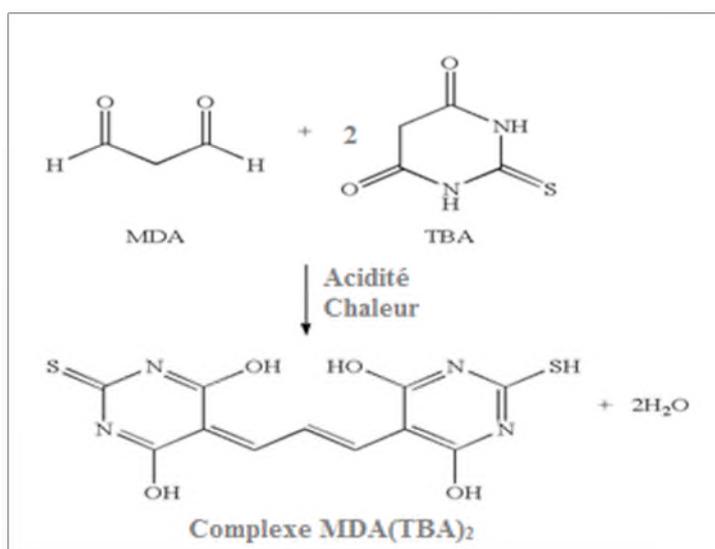


Fig. 18: Le complexe MDA-TBA (Lefèvre *et al.*, 1998).

❖ Mode opératoire

Afin d'évaluer le taux hépatique du MDA, le protocole de Ohkawa *et al.* (1979) a été suivi avec quelques modifications :

A 200 μl d'homogénats de foie, les solutions suivantes ont été additionnées: 200 μl de SDS (8,1 %), 600 μl d'eau distillée et 1,5 ml de TBA à 1 % dissout dans de l'acide acétique à 20 % dont le pH est ajusté à 3,5. Après agitation, le mélange a été mis dans un bain mari à 95°C pendant 60 minutes, ensuite refroidi puis additionné de 1ml d'eau distillée et 3,5 ml du mélange 1-butanol-pyridine. Après agitation, les tubes ont été centrifugés à 4000 g/10 min. Ensuite, la couche organique contenant le MDA a été prélevée et son absorbance a été mesurée à 532 nm par un spectrophotomètre de marque SHIMADZU contre un blanc préparé dans les mêmes conditions sans l'homogénat.

La quantité du MDA dans l'échantillon a été exprimée en nmol MDA/mg de protéines en utilisant le coefficient d'extinction molaire du complexe MDA-TBA: $1,56 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

II.2.2.7- Etude histopathologique du foie

Les coupes histologiques des foies ont été réalisées à l'hôpital Frantz Fanon -Béjaia, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique. Cette étude permet de valider

l'éventuelle hépatoprotection de l'extrait de *P. nigra* à travers la visualisation microscopique des foies des différents groupes et détecter, pour chacun, la présence ou l'absence de lésions.

❖ **Mode opératoire**

Des segments de foie ont été fixés dans du formol (10 %) puis déposés dans des cassettes en plastique. Celles-ci ont été placées dans un automate d'inclusion où les segments ont été déshydratés dans 7 bains successifs d'éthanol à 90 % suivis de 3 bains de xylène et 2 bains de paraffine (1h30 chacun). Puis, vient l'étape d'enrobage dans la paraffine où l'inclusion de nos échantillons est réalisée dans des moules permettant la confection de blocs. Ces derniers ont été montés ensuite sur le microtome pour subir un dégrossissement générant des coupes de 4 µm d'épaisseur. Les coupes ont été ensuite déparaffinées par chauffage à l'étuve pendant 2 heures, à 80°C.

Pour mettre en évidence les cellules, la coloration hématoxyline-éosine (HE) a été réalisée : les coupes ont été d'abord déparaffinées dans 3 bains de xylène (15 min) puis réhydratées par submersion dans 3 bains d'alcool (6 min). Après rinçage avec de l'eau courante, les coupes réhydratées ont été placées dans un bain d'hématoxyline (2 min) pour colorer les noyaux, l'excès de colorant a été enlevé par rinçage avec l'eau courante. Ces coupes ont été mises ensuite dans un bain d'éosine (30 sec) pour colorer le cytoplasme, l'excès de colorant a été enlevé par rinçage avec de l'eau suivie de 3 bains d'alcool (3 min) et 3 bains de xylène (15 min). Enfin, vient l'étape du montage, les lames colorées ont été couvertes de lamelles (qui s'y fixent par l'eukitt) et prêtes à l'observation microscopique (objectif x 10).

II.2.3- Analyse des résultats

Les résultats des tests ont été exprimés en moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel Graph Pad Prism 5.0, one way ANOVA, suivi du test de Dunnett pour la comparaison. Les différences ont été considérées comme significatives à $p < 0,05$.

Résultats

Et

Discussion

III.1- RESULTATS

L'effet hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique de bourgeons de *P. nigra* a été évalué en utilisant la souris comme modèle animal. L'hépatotoxicité a été induite par l'injection intra-péritonéale d'une dose de 400 mg/kg du paracétamol. Plusieurs tests ont été réalisés pour déterminer l'effet préventif de l'extrait, et cela, à travers le dosage des transaminases, la mesure des taux hépatiques de MDA et une étude histopathologique du foie.

III.1.1- Evaluation des taux sériques des transaminases (ALAT et ASAT)

III.1.1.1- Effet de l'extrait sur les taux des transaminases chez des souris normales

Les souris des groupes contrôles, traitées par l'extrait 100 mg/kg et 300 mg/kg, n'ont révélé aucune différence significative dans les taux de ALAT ($50,16 \pm 8,5$ UI/L; $55,5 \pm 10,51$ UI/L) et de ASAT ($164,5 \pm 12,56$ UI/L; $225,66 \pm 17,39$ UI/L) respectivement, comparativement au groupe ayant reçu que le véhicule dont les taux de ALAT et de ASAT sont ($56,33 \pm 6,63$ UI/L) et ($225 \pm 11,11$ UI/L) respectivement (Tableau III).

Tableau III: L'effet de l'extrait sur les taux sériques des transaminases chez des souris normales.

	V	PN 100	PN 300
ALAT (UI/L)	$56,33 \pm 6,63$	$50,16 \pm 8,5$	$55,5 \pm 10,51$
ASAT (UI/L)	$225 \pm 11,11$	$164,5 \pm 12,56$	$225,66 \pm 17,39$

V: Véhicule (CMC 0,8 %), PN 100: *P. nigra* 100 mg/kg, PN 300: *P. nigra* 300 mg/kg. Toutes les valeurs sont représentées par la moyenne \pm SEM, (N = 6), one-way ANOVA, suivie du test de Dunnett, a été utilisée pour l'analyse statistique [#]P < 0,05; ^{##}P < 0,01; ^{###}P < 0,001 comparé au groupe control (V).

II.1.1.2- Effet de l'extrait sur les taux des transaminases chez des souris traitées par le paracétamol

Il a été observé une augmentation très hautement significative ($P < 0,001$) des taux sériques de ALAT ($144,56 \pm 19,96$ UI/L) et de ASAT ($425,98 \pm 57,40$ UI/L) au niveau du groupe traité par le paracétamol (400 mg/kg) en comparaison au groupe véhicule ayant reçu l'eau physiologique dont ALAT et ASAT sont ($56,33 \pm 6,63$ UI/L) et ($225 \pm 11,11$ UI/L) respectivement. La silymarine (100 mg/Kg), utilisée comme standard, a rétabli les niveaux de ALAT ($53,83 \pm 3,12$ UI/L) et ASAT ($232 \pm 20,76$ UI/L) à des taux physiologiques comparables à ceux enregistrés au niveau du groupe véhicule (Tableau IV).

L'administration de l'extrait de bourgeons de *P. nigra* à 100 mg/kg suivie d'une dose de 400 mg/kg de PCM a montré une diminution très hautement significative ($P < 0,001$) dans les taux de ALAT ($56,66 \pm 8,99$ UI/L) et de ASAT ($211,5 \pm 8,97$ UI/L), comparativement au groupe PCM. Le prétraitement des souris avec l'extrait à 300 mg/kg, suivi d'une dose de 400 mg/kg de PCM, a réduit d'une manière hautement significative ($P < 0,01$) les taux de ALAT ($83,83 \pm 10,36$ UI/L) et ASAT ($285 \pm 25,35$ UI/L) en comparaison au groupe PCM. Les résultats obtenus avec les deux doses (100 mg/kg et 300 mg/kg) sont comparables à ceux obtenus avec la silymarine (Tableau IV).

Tableau IV: L'effet de l'extrait sur les taux sériques des transaminases chez des souris intoxiquées par le paracétamol (400 mg/kg).

	V	PCM	SILY	Test 100	Test 300
ALAT (UI/L)	$56,33 \pm 6,63$	$144,56 \pm 19,96^{###}$	$53,83 \pm 3,12^{***}$	$56,66 \pm 8,99^{***}$	$83,83 \pm 10,36^{**}$
ASAT (UI/L)	$225 \pm 11,11$	$425,98 \pm 57,40^{###}$	$232 \pm 20,76^{***}$	$211,5 \pm 8,97^{***}$	$285 \pm 25,35^{**}$

V: Véhicule (CMC 0,8 %), PCM: Paracétamol 400 mg/kg, SILY: Silymarine 100 mg/kg, Test 100: *P. nigra* 100 mg/kg + paracétamol 400 mg/kg, Test 300: *P. nigra* 300 mg/kg + paracétamol 400 mg/kg. Toutes les valeurs sont représentées par la moyenne \pm SEM, (N = 6), one-way ANOVA, suivie du test de Dunnett, a été utilisée pour l'analyse statistique $^{\#}P < 0,05$; $^{\#\#}P < 0,01$; $^{\#\#\#}P < 0,001$ comparé au groupe véhicule (V) et $^*P < 0,05$; $^{**}P < 0,01$; $^{***}P < 0,001$ comparé au groupe intoxiqué par le paracétamol (PCM).

III.1.2- Evaluation des taux hépatiques de MDA

III.1.2.1- Effet de l'extrait sur les taux hépatiques de MDA chez des souris normales

Les taux hépatiques de MDA chez les souris normales traitées par l'extrait à 100 mg/kg et 300 mg/kg sont ($3,94 \pm 0,13$ et $3,65 \pm 0,61$ nmol MDA/mg protéines) respectivement. Ces niveaux n'ont montré aucune différence significative, comparativement au groupe véhicule ($3,57 \pm 0,49$ nmol MDA/mg protéines) (Figure 19).

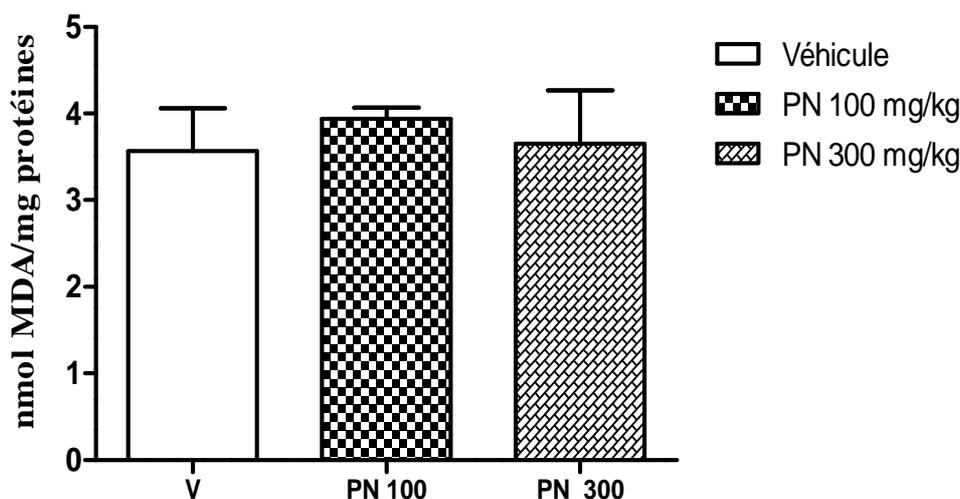


Fig. 19: L'effet de l'extrait sur les taux hépatiques de MDA chez des souris normales.

V: Véhicule (CMC 0,8 %), PN 100: *P. nigra* 100 mg/kg, PN 300: *P. nigra* 300 mg/kg. Toutes les valeurs sont représentées par la moyenne \pm SEM, (N = 7), one-way ANOVA, suivie du test de Dunnett, a été utilisée pour l'analyse statistique [#]P < 0,05; ^{##}P < 0,01; ^{###}P < 0,001 comparé au groupe véhicule (V).

II.1.2.2- Effet de l'extrait sur les taux hépatiques de MDA chez des souris traitées par le paracétamol

Une augmentation très hautement significative ($P < 0,001$) des niveaux de MDA hépatique a été observée chez les souris traitées par le PCM à 400 mg/kg ($7,47 \pm 0,93$ nmol MDA/mg protéines) comparativement au groupe ayant reçu le véhicule ($3,57 \pm 0,49$ nmol MDA/mg protéines) (Figure 20).

Le prétraitement des souris avec l'extrait 100 mg/kg et 300 mg/kg suivi d'une seule dose de PCM à 400 mg/kg a réduit de manière très hautement significative ($P < 0,001$) les taux de

MDA hépatique ($3,27 \pm 0,23$ et $1,63 \pm 0,22$ nmol MDA/mg protéines) respectivement (Figure 20), avec des pourcentages d'inhibition de ($50,91 \pm 8,16$ % et $76,29 \pm 3,98$ %) (Figure 21).

Les taux de MDA enregistrés au niveau des groupes traités par l'extrait à 100 mg/kg et 300 mg/kg sont comparables à ceux trouvés chez les souris prétraitées par la silymarine ($2,13 \pm 0,12$ nmol MDA/mg protéines) (Figure 20) ayant exhibé un pourcentage d'inhibition de ($67,95 \pm 4,93$ %) (Figure 21).

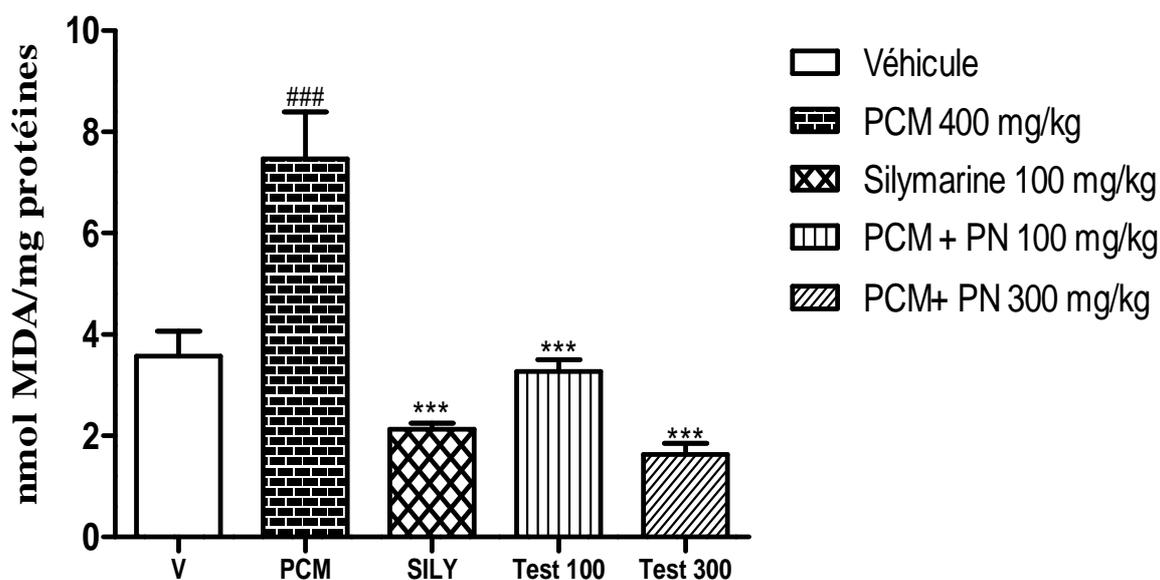


Fig. 20: L'effet de l'extrait sur les taux hépatiques de MDA chez des souris intoxiquées par le paracétamol (400 mg/kg).

V: Véhicule (CMC 0,8 %), PCM: Paracétamol 400mg/kg, SILY: Silymarine 100 mg/kg, Test 100: *P. nigra* 100 mg/ kg + paracétamol 400 mg/kg, Test 300: *P. nigra* 300 mg/kg + paracétamol 400 mg/kg. Toutes les valeurs sont représentées par la moyenne \pm SEM, (N = 7), one-way ANOVA, suivie du test de Dunnett, a été utilisée pour l'analyse statistique #P < 0,05; ##P < 0,01; ###P < 0,001 comparé au groupe véhicule (V) et *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 comparé au groupe intoxiqué par le paracétamol (PCM).

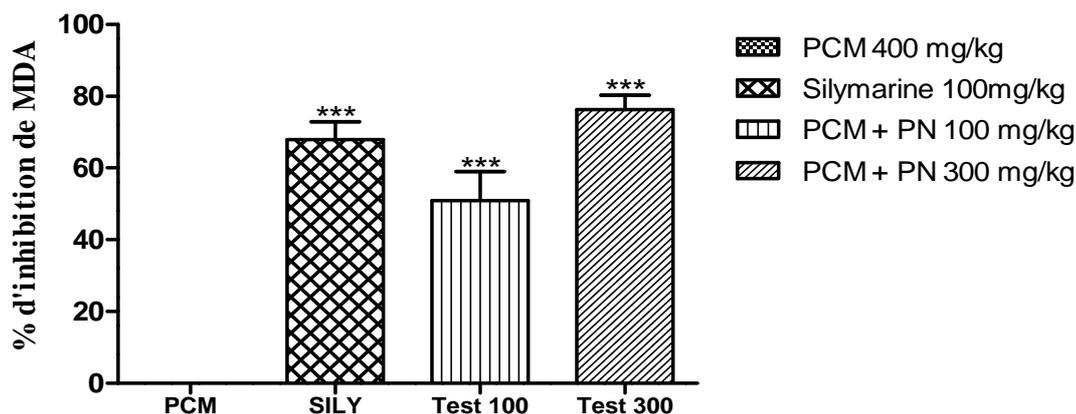


Fig. 21: Les pourcentages d'inhibition de l'extrait sur les taux hépatiques de MDA chez des souris intoxiquées par le paracétamol (400 mg/kg).

SILY: Silymarine 100 mg/kg, Test 100: *P. nigra* 100 mg/kg + paracétamol 400 mg/kg, Test 300: *P. nigra* 300 mg/kg + paracétamol 400 mg/kg. Toutes les valeurs sont représentées par la moyenne \pm SEM, (N = 7), one-way ANOVA, suivie du test de Dunnett, a été utilisée pour l'analyse statistique *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 comparé au groupe intoxiqué par le paracétamol (PCM).

II.1.3- L'étude histopathologique du foie :

Les examens histopathologiques des sections de foie des souris sont représentés dans la figure 22 et 23. Il a été observé une structure hépatique normale chez le groupe véhicule, représentée par des sinusoides d'aspect normale, une veine centro-lobulaire congestive d'aspect normal et des hépatocytes bien délimités arrangés sous forme de lames hépatocytaires anastomosées (Figure 22. A1-2). Aucune lésion hépatique n'a été observée (absence de nécrose, de stéatose et d'infiltration de neutrophile) chez ce groupe.

Les tissus hépatiques des groupes contrôles traités par l'extrait à 100 mg/kg et 300 mg/kg ont montré une architecture semblable à celle du groupe véhicule (Figure 22. C1-2 ; D1-2), ce qui montre la non toxicité de l'extrait.

Les souris traitées avec du paracétamol (400 mg/kg) ont exhibé une altération de la structure hépatique. Plusieurs types de lésions ont été décelées, parmi elles, la dilatation et la congestion de la veine centro-lobulaire, des infiltrations des neutrophiles, des stéatoses et des foyers de nécrose (Figure 22. B1-2). La structure hépatique normale a été restaurée chez les souris prétraitées avec la silymarine (100 mg/kg) (Figure 23. B1-2), extraits 100 mg/kg, (Figure 23. C1-2) et 300 mg/kg (Figure 23. D1-2). Aucune nécrose, stéatose ou infiltration de neutrophile n'a été trouvée.

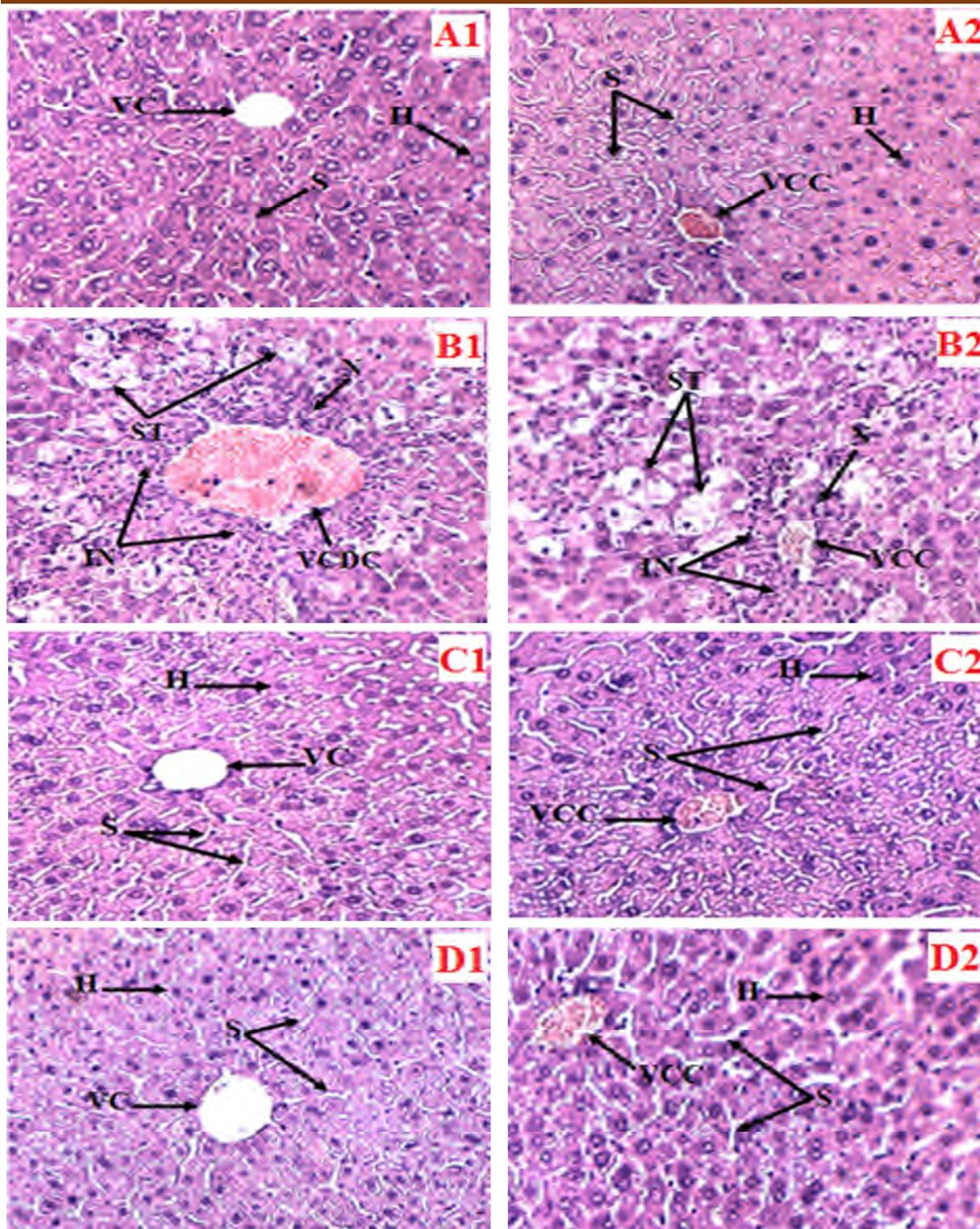


Fig. 22: Observation microscopique des coupes de foie chez des souris ayant reçu le véhicule et l'extrait brut à 100 et 300 mg/kg (coloration HE avec G: 10×10).

A1-2: Véhicule (CMC à 0,8 %), **B1-2:** Groupe PCM (400 mg/kg), **C1-2:** Contrôle 100 (*P. nigra* 100 mg/kg), **D1-2:** Contrôle 300 (*P. nigra* 300 mg/kg). H: Hépatocyte, S: Sinusoïde, VC: Veine centrale, VCC: Veine centrale congestive, VCDC: Veine centrale dilatée et congestive, ST: Stéatose, IN: Infiltration des neutrophiles, N: Nécrose.

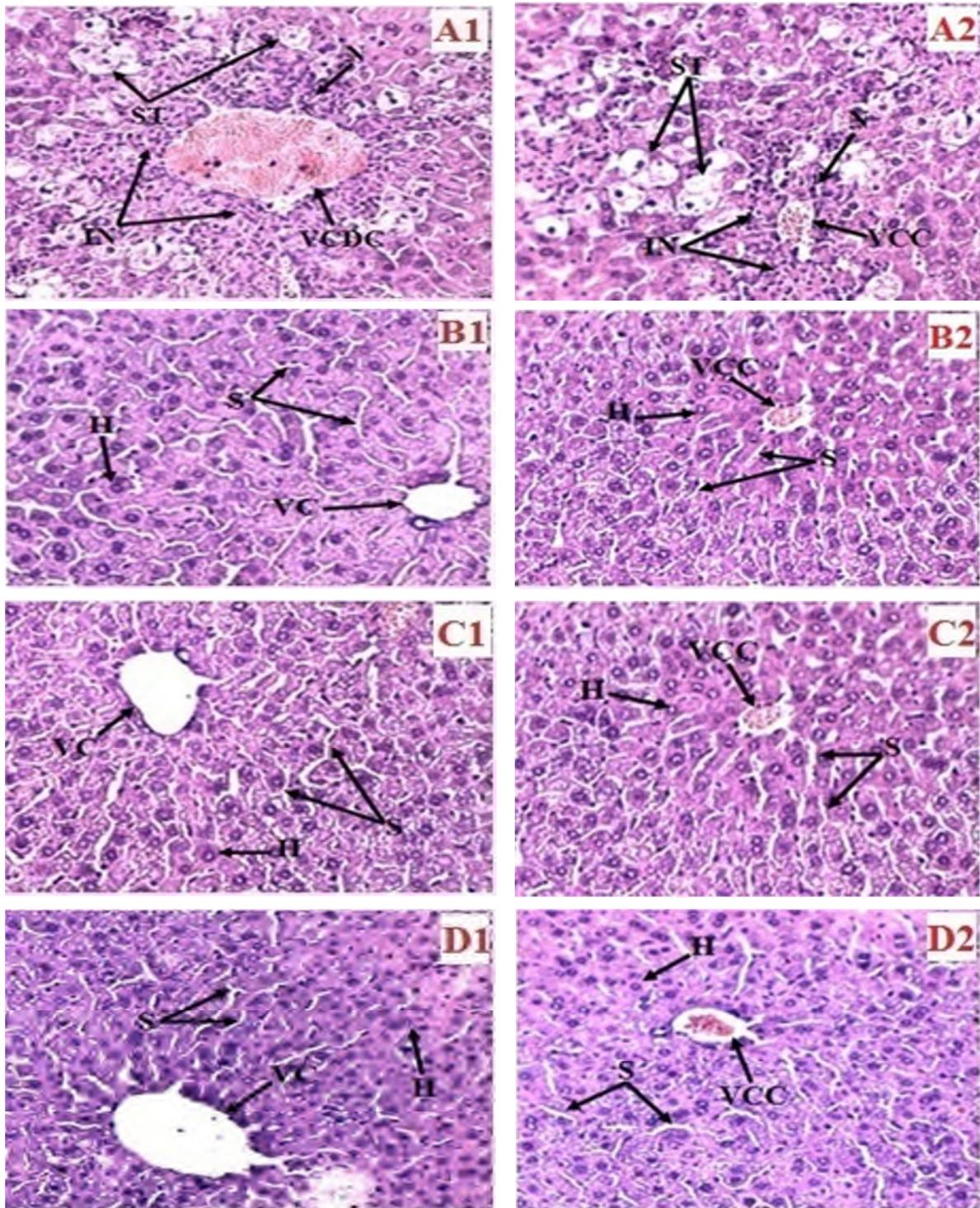


Fig. 23: Observation microscopique des coupes de foie chez des souris ayant reçu le véhicule, la silymarine, l'extrait 100 mg/kg et l'extrait 300 mg/kg suivis d'une dose de PCM (400 mg/kg) (coloration HE avec G: 10×10).

A1-2: Groupe PCM (400 mg/kg), **B1-2:** Standard (Silymarine à 100 mg/kg + PCM 400 mg/kg), **C1-2:** Test 100 (*P. nigra* 100 mg/kg + PCM 400 mg/kg), **D1-2:** Test 300 (*P. nigra* 300 mg/kg + PCM 400 mg/kg).
 H: Hépatocyte, S: Sinusoïde, VC: Veine centrale, VCC: Veine centrale congestive, VCDC: Veine centrale dilatée et congestive, ST: Stéatose, IN: Infiltration des neutrophiles, N: Nécrose.

III.2- DISCUSSION

L'être humain est exposé à plusieurs substances toxiques d'origine endogène ou de provenance exogène qui sont généralement détoxifiées par le foie. Le NAPQI, métabolite issu de l'oxydation du paracétamol par le CYP 450, est l'une des toxines éliminées par le foie grâce à sa conjugaison à l'antioxydant GSH (Meister et Anderson, 1983). L'accumulation de NAPQI induit l'épuisement de l'antioxydant (Reid *et al.*, 2005) menant ainsi à l'hépatotoxicité par plusieurs mécanismes, parmi eux la peroxydation lipidique (Hinson, 2010). L'hépatotoxicité induite par le paracétamol est très fréquente car il est l'antalgique et l'antipyrétique le plus utilisé mondialement (Mitchell *et al.*, 2011). Cette hépatotoxicité peut engendrer différentes pathologies telles que la stéatose (Pachikian *et al.*, 2010) et représente la première cause d'insuffisance hépatique aiguë en Europe et en Amérique du Nord (Larocque, 2013).

Au cours des dernières années, l'utilisation de médicaments à base de plantes pour le traitement des maladies du foie a augmenté partout dans le monde (Luyckx et Scheen, 1997). Par conséquent, remplacer les remèdes synthétiques ayant des effets secondaires tels que le NAC qui cause l'urticaire et l'hypotension (Larocque, 2013) par des molécules d'origine naturelle qui ne retiennent que l'efficacité thérapeutique souhaitée, est devenue la priorité de plusieurs laboratoires de pharmacologie.

Populus nigra est une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour prévenir et guérir plusieurs pathologies (Fournier, 2010). Afin de valider cette utilisation, plusieurs études ont été conduites sur ses bourgeons. Ces derniers ont montré différentes activités biologiques telles que l'activité anti-inflammatoire (Karawya *et al.*, 2010; Debbache *et al.*, 2013), antioxydant (Dudonné *et al.*, 2011), antibactérienne (Vardar-Ünlü *et al.*, 2008; Al-Hussaini et Mahasneh, 2009) ainsi qu'une activité anti-peroxydation lipidique *in vitro* (Debbache *et al.*, 2014). Ce qui a permis de suggérer que cette plante pourrait avoir une activité anti-peroxydation lipidique *in vivo* protégeant ainsi le foie contre un stress oxydant.

Afin de pouvoir tester l'effet hépatoprotecteur de bourgeons de *P. nigra*, l'extraction des principes actifs contenus dans cette partie est une étape indispensable. Il a été rapporté que cette extraction est influencée par la méthode d'extraction, la taille des particules, la période de la récolte et les conditions de stockage (Chavan *et al.*, 2001).

L'éthanol est un excellent solvant qui permet l'extraction des polyphénols et possède une faible toxicité en comparaison à celle du méthanol (Cowan, 1999). Pour cela, l'extrait éthanolique de bourgeons de *P. nigra* a été utilisé pour cette étude. Il a été préparé à partir d'une fine poudre de 63 µm dans le but d'augmenter la surface d'échange entre le solvant et le matériel solide (la poudre).

La période expérimentale a duré 5 jours car en comparaison à la littérature, cette durée est largement suffisante pour déterminer le potentiel hépatoprotecteur de l'extrait d'une plante (Rasheed *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2011; Forouzandeh *et al.*, 2012). Plusieurs études ont montré que le paracétamol est un modèle expérimental prometteur pour évaluer l'effet hépatoprotecteur des extraits de plantes car l'utilisation d'une seule dose était suffisante pour induire l'hépatotoxicité (Kanbur *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2012; Soliman *et al.*, 2014; Naguib *et al.*, 2014), alors que d'autres substances telles que l'aluminium nécessitent plusieurs doses et une plus longue durée expérimentale (Ighodaro *et al.*, 2012). Pour induire cette hépatotoxicité, la voie intra-péritonéale a été adoptée car l'effet qu'elle induit est plus rapide que la voie intra-gastrique. Mais elle est moins efficace que la voie intraveineuse qui malheureusement demeure difficile à réaliser chez les souris.

L'effet de l'extrait brut sur des biomarqueurs (ALAT, ASAT et MDA) a été testé car toute altération des niveaux basaux de ces paramètres est considérée comme signes de toxicités. Sous des conditions physiologiques ALAT et ASAT permettent la génération du pyruvate et de l'oxaloacétate, respectivement (Naguib *et al.*, 2014) qui sont indispensables pour le cycle de Krebs (Marieb, 2008), en plus de la génération du glutamate (Naguib *et al.*, 2014) qui est un acide aminé glucoformateur et le neurotransmetteur excitateur le plus important du système nerveux central (Marieb, 2008). Le MDA quand à lui permet l'activation du collagène type I, des cellules stellaires et de la voie NFκB (Strain et Diehl, 2012).

Dans la présente étude, l'administration de 400 mg/kg du PCM par voie intra-péritonéale aux souris a conduit à une augmentation significative des taux sériques de ALAT ($144,56 \pm 19,9$ UI/L) en comparaison au groupe véhicule. ALAT est une enzyme spécifique du foie, retrouvée dans le cytosol des hépatocytes et est fortement libérée dans le sang lors de la lyse hépatocytaire. ASAT, quant à elle, est retrouvée dans les mitochondries des hépatocytes, des reins, du cerveau, du muscle cardiaque et squelettique (Naguib *et al.*, 2014). Elle est libérée excessivement dans la circulation sanguine suite à des dommages structurels

du foie, ce qui explique l'augmentation significative des niveaux de cette enzyme chez le groupe ayant reçu le PCM ($425,98 \pm 57,40$ UI/L) comparativement au groupe véhicule.

Le PCM a également induit une augmentation significative des niveaux hépatiques du métabolite terminal de la peroxydation lipidique, le MDA ($7,47 \pm 0,93$ nmol MDA/mg protéines) en comparaison au groupe véhicule. Ces résultats ont été confirmés par l'étude histopathologique qui a montré que le PCM a induit des dilatations et congestions de la veine centro-lobulaire, des stéatoses, des nécroses et des infiltrations des neutrophiles (Figure 22. B1-2).

Ces observations sont probablement dues à l'accumulation du NAPQI qui conduit à l'épuisement du GSH permettant ainsi la génération des espèces réactives de l'oxygène. Ces dernières provoquent la transition de la perméabilité mitochondriale à travers la peroxydation lipidique (Hinson, 2010) qui générera à son tour le MDA (Michel *et al.*, 2008). Le NAPQI et le MDA aboutissent à la formation des adduits protéiques NAPQI-cystéine (Reid *et al.*, 2005) et MDA-lysine (Michel *et al.*, 2008). Les antigènes de ces adduits protéiques se présentent sur les cellules présentatrices d'antigènes qui activeront les cellules T cytotoxiques. Ces dernières libèrent le TNF- α , les perforines et les granzymes qui sont responsables de la nécrose des hépatocytes. Cette nécrose est suivie par la libération des DAMPs (Danger-associated molecular patterns) qui vont activer les cellules de Kupffer. L'activation de ces cellules permet la sécrétion des médiateurs inflammatoires, des cytokines et des chimiokines favorisant l'apoptose des hépatocytes et activant le système immunitaire inné. Ceci conduit au recrutement et l'accumulation des monocytes et neutrophiles au site de l'inflammation et des nécroses hépatocytaires (Krenkel *et al.*, 2014) induisant ainsi une large congestion et dilatation de la veine centro-lobulaire.

Les stéatoses observées (Figure 22. B1-2) sont le résultat du stress oxydant qui touche le reticulum endoplasmique. Ceci active le facteur de transcription SREPB-c1 (Sterol Regulatory Element binding protein -c1) qui stimule la synthèse excessive des lipides favorisant ainsi leur accumulation dans des vacuoles (Pachikian *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus sont comparables à ceux de plusieurs travaux (Kanbur *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2012; Naguib *et al.*, 2014). L'étude de Pandey et ses collaborateurs (2012) a montré que l'administration d'une dose de 250 mg/kg par voie orale était suffisante pour induire l'hépatotoxicité, avec des taux hépatiques du MDA de ($4,243 \pm 0,478$ nmol MDA/mg protéines) accompagnés par des lésions hépatiques

centro-lobulaires. Comme il a été montré par Liu et ses collaborateurs (2011) que l'utilisation d'une dose de 400 mg/kg par la voie intraveineuse a induit une hépatotoxicité plus sévère qui se manifeste par l'augmentation des taux du MDA ($8,29 \pm 1,20$ nmol MDA/mg protéines). Pour cela, le degré d'hépatotoxicité dépend de la dose du PCM et de la voie de son administration.

La silymarine est un mélange de flavonoïdes (taxifoline, silybine, isosilybine, silydianine, silychristine et isosilychristine), extraits de graines de *Silybum marianum* (Das *et al.*, 2011). Il a été établi que la silymarine est très efficace en tant qu'agent hépatoprotecteur. Elle est maintenant largement utilisée en thérapie lors des affections hépatiques et commercialisée sous le nom de Legalon® (Luyckx et Scheen, 1997). De ce fait, elle est considérée comme molécule de référence dans les évaluations hépatoprotectrices des extraits de plantes (Pandey *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2013; Olaleye *et al.*, 2014).

Son utilisation à 100 mg/kg a permis de rétablir de manière significative les taux de MDA ($2,13 \pm 0,12$ nmol MDA/mg protéines), ALAT ($53,83 \pm 3,12$ UI/L) et ASAT ($232 \pm 20,76$ UI/L) comparativement au groupe traité par le PCM. Ceci est soutenu par la présence d'une structure hépatique d'aspect normale. Ces résultats coïncident avec ceux d'autres travaux (Ali *et al.*, 2013; Pandey *et al.*, 2012). L'effet protecteur de ce standard est dû aux flavonoïdes qui agissent comme un scavenger de radicaux libres, protégeant ainsi la cellule de la peroxydation lipidique (Fakurazi *et al.*, 2008). De plus, ils restaurent les niveaux du GSH et du système antioxydant, inhibent le facteur NFκB (Das *et al.*, 2011) et la CYP450 (Jančová *et al.*, 2007).

Avant de tester l'effet de l'extrait éthanolique de bourgeons de *P. nigra* sur des souris intoxiquées par le PCM, la vérification de sa toxicité était nécessaire. Le traitement des souris avec l'extrait 100 mg/kg et 300 mg/kg a montré une stabilité dans leur poids corporel durant la période expérimentale (Annexe 2) avec absences de comportements anormaux et de mortalité. D'autre part, aucune différence significative n'a été observée dans les taux de MDA, ALAT et ASAT en comparaison au groupe véhicule. Les résultats de l'étude biochimique sont consolidés par ceux de l'étude histologique qui révèlent la présence de structures hépatiques d'aspect normal. Ces résultats permettent donc de valider que l'extrait de bourgeons de *P. nigra* n'est pas toxique en considérant son effet sur les paramètres dosés et la structure du tissu hépatique. La non toxicité de cette plante est confirmée par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (AAPAM), l'autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs) et la comité scientifique de l'aliment (CSA) qui ont autorisé

son utilisation comme additif alimentaire (EFSA Journal, 2012). Par conséquent, le potentiel hépatoprotecteur de l'extrait pourrait être testé.

Le prétraitement des souris avec l'extrait éthanolique des bourgeons de *P. nigra* (100 mg/kg et 300 mg/kg) suivi d'une dose de PCM (400 mg/kg) a permis une réduction significative des taux de ASAT, ALAT et MDA en comparaison au groupe PCM. L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative entre les groupes tests 100 et 300 mg/kg, suggérant ainsi que l'extrait est actif à faible dose.

L'étude histologique a exhibé que les lésions sévères provoquées par le paracétamol ont été remarquablement réduites par l'administration de l'extrait, vu l'absence de nécrose et de stéatose. De plus, il s'est avéré que le profil pharmacologique de ces extraits est comparable à celui de la silymarine, (réduction des taux des transaminases et du MDA), suggérant ainsi qu'ils peuvent agir par les mêmes mécanismes.

En se basant sur la littérature (Kanbur *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011), l'extrait de bourgeons de *P. nigra* peut être considéré comme une source de phytochimiques capables de contrer l'hépatotoxicité induite par le paracétamol.

Les résultats obtenus permettent de suggérer que le potentiel hépatoprotecteur de l'extrait, réduisant ainsi les taux hépatiques du MDA, peut être dû à son activité anti-péroxydation lipidique *in vivo*. En outre, l'absence des infiltrations des neutrophiles, des nécroses et/ou de l'apoptose qui sont confirmées par la réduction de la libération des transaminases peut être dû à l'activité anti-inflammatoire et anti-apoptotique de cet extrait. Par conséquent, ces activités sont en partie responsables de l'activité hépatoprotectrice de l'extrait de *P. nigra*.

Par ailleurs, l'effet hépatoprotecteur de cette plante peut être dû à sa richesse en phyto-constituants qui ont été déjà identifiés par des études antérieures telles que les flavonoïdes, l'acide caféique (Greenaway *et al.*, 1988; 1990), le salicylate (Rubiolo *et al.*, 2013; Dudonné *et al.*, 2011) et la quercétine (Palo, 1983). D'autres travaux ont élucidé les mécanismes de ces principes actifs comme origine de la protection contre l'intoxication induite par le PCM (Lee *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Ceci permet donc de suggérer que l'extrait éthanolique de bourgeons de *P. nigra* pourrait agir par l'une des voies ou la combinaison de plusieurs voies citées ci-dessous:

L'effet anti-inflammatoire de *P. nigra*, révélé par cette étude, a été déjà déterminé par Karawya et al. (2010) et Debbache et al. (2013). Ceci est probablement dû à l'inhibition de la voie NFκB. Cette suggestion est soutenue par d'autres travaux, ayant démontré que le salicylate (Wu, 2005), l'acide caféique (Lee et al., 2010) et les flavonoïdes (Liu et al., 2011; Zhang et al., 2013) inhibent l'expression des molécules pro-inflammatoires, NOSi et COX.

L'étude de Dudonné et al. (2011) a montré que l'extrait de bourgeons de *P. nigra* présente une activité antioxydant en augmentant l'expression des gènes des molécules antioxydantes. Cette activation est probablement due à la présence de l'acide caféique. Par ailleurs, les travaux de Lee et al. (2010) ont montré que l'acide caféique active le facteur Nrf 2 et induit la synthèse des molécules anti-oxydantes et des enzymes de détoxification de la phase II.

Aussi, l'acide salicylique, un piègeur des radicaux hydroxyles (Rohnert et al., 1998), peut être responsable de l'activité antioxydant. Un autre mécanisme d'hépatoprotection plausible est l'inhibition de la CYP450 par les flavonoïdes présents dans l'extrait de bourgeons de *P. nigra*, ce qui empêche la transformation du paracétamol en son métabolite hautement réactif, le NAPQI (Zhang et al., 2013).

L'augmentation de la vitesse d'expression de l'enzyme limitante dans la synthèse de GSH (c-glutamyl-cystéine synthétase) par la quercétine conduit à des concentrations intracellulaires élevées du glutathion (Myhrstad et al., 2002). Ceci permet de suggérer que la quercétine empêche l'épuisement du glutathion par le NAPQI et ainsi prévient l'hépatotoxicité.

Les mécanismes suggérés doivent être vérifiés pour l'extrait testé. Ainsi, il serait intéressant de trouver d'autres mécanismes qui pourraient être à l'origine de l'effet hépatoprotecteur de la plante sélectionnée. Comme toute recherche, la rencontre d'inconvénients est inévitable. Cependant, l'apport d'amélioration est souhaitable car la méthode colorimétrique appliquée pour le dosage de MDA est une méthode non spécifique.

Conclusion

Et

Perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le foie s'avère comme étant l'un des organes indispensables pour le bon fonctionnement de l'organisme car il assure plusieurs fonctions dont le métabolisme, le stockage et l'épuration. Le paracétamol, un antalgique antipyrétique, est métabolisé au niveau du foie générant un métabolite hautement actif et toxique.

Ce travail avait pour but d'évaluer l'effet hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique de bourgeons de *Populus nigra* contre une intoxication par le paracétamol. Il s'est avéré que le prétraitement des souris par des doses de 100 mg/kg et 300 mg/kg, suivi d'une seule dose intrapéritonéale du paracétamol à 400 mg/kg, a réduit de manière significative ($p < 0,001$) les taux des transaminases et du MDA comparativement au groupe PCM. Ces résultats ont été consolidés par l'étude histologique qui a révélé une structure hépatique globalement normale comparativement à la structure altérée observée chez les souris du groupe traité par le PCM. Aussi, les taux des transaminases et du MDA mesurés en présence de l'extrait éthanolique ont été comparables à ceux obtenus avec la molécule hépatoprotectrice, la silymarine. En outre, aucune différence significative n'a été observée entre les deux doses, ce qui indique que cet extrait est actif à faible dose.

L'effet hépatoprotecteur de cette plante est probablement lié aux métabolites secondaires contenus dans ses bourgeons. Ces derniers doués d'activités antioxydant, anti-péroxydation lipidique et anti-inflammatoire sont en partie responsables de l'activité testée.

Comme perspective très rapprochée, il serait intéressant de tester l'effet curatif de l'extrait éthanolique de bourgeons de *P. nigra*. Par ailleurs, les résultats de ce mémoire peuvent être une initiation à un projet de recherche qui aura comme but de fractionner l'extrait de bourgeons de *P. nigra*. Une purification et une identification des principes actifs responsables de l'effet hépatoprotecteur s'avère importante pour la détermination du mécanisme d'action dans le but d'une application pharmacologique.

*Références
Bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdel-Misih, S. R. Z. et Bloomston M. (2010). Liver anatomy. *Surgical Clinics of North America*, **90** (4): 643-653.

Al-Hussaini, R. et Mahasneh, A. M. (2009). Microbial growth and quorum sensing antagonist activities of herbal plants extracts. *Molecules*, **14**: 3425-3435.

Ali, M. Qadir, M. I. Saleem, M., Janbaz, K. H., Gul, H., Hussain, L. et Ahmad, B. (2013). Hepatoprotective potential of *Convolvulus arvensis* against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Journal of the Bangladesh Pharmacological Society*, **8**: 300-304.

B

Barrière, D., Mallet, C. et Eschalier, A. (2010). Le paracétamol de nouvelles cibles pour un vieux médicament. *La Lettre*, **33**: 1-7.

Bellier, R. (2011). *Toxicité hépatique du paracétamol à dose thérapeutique: Revue de littérature et proposition d'un protocole d'évaluation en période postopératoire.* Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine, faculté de médecine, Université de Limoges, 2011, P. 25.

Beloued, A. (2001). *Plantes médicinales d'Algérie.* 5^{ème} éd. Alger: Office des publications universitaires. P. 162.

Böhm, F., Köhler, U. A., Speicher, T. et Werner, S. (2010). Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *Molecular Medicine*, **2**: 294-305.

Botting, R. (2003). COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thrombosis Research*, **110**: 269-272.

Botting, R. M. (2000). Mechanism of action of acetaminophen: Is There a Cyclooxygenase 3? *Clinical Infectious Diseases*, **31**: 202-210.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.

Bruneton, J. (1999). Les composés phénoliques; Terpène et stéroïdes; Alcaloïdes. In: *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales.* 3^{ème} éd. Paris: Lavoisier. P.233-800.

Bruneton, J. (2009). Les composés phénoliques; Terpène et stéroïdes; Alcaloïdes. In: *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales.* 4^{ème} éd. Paris: Lavoisier. P. 261-945.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

C

Chavan, U. D., Shahidi, F. et Naczk, M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus L.*) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, **75**: 509-512.

Chen, X., Sun, C. K., Han, G. Z., Peng, J. Y., Li, Y., Liu, Y. X., Lv, Y. Y., Liu, K. X., Zhou, Q. et Sun, H. J. (2009). Protective effect of tea polyphenols against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice is significantly correlated with cytochrome P450 suppression. *World Journal of Gastroenterology*, **15** (15): 1829-1835.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12** (4): 564-582.

D

Das, S., Roy, P., Auddy, R. G. et A., mukherjee (2011). Silymarin nanoparticle prevents paracetamol-induced hepatotoxicity. *International Journal of Nanomedicine*, **6**: 1291-1301.

Davila, J. C., Lenherr, A. et Acosta, D. (1989). Protective effect of flavonoids on drug-induced hepatotoxicity *in vitro*. *Toxicology*, **57**: 267-286.

Debbache-Benaïda, N., Atmani-Kilani, D., Schini-Keirith, V. B., Djebbli, N. et Atmani, D. (2013). Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, antiinflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **3** (9): 697-704.

Debbache, N., Atmani, D. et Atmani, D. (2014). Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*, flower buds extracts as source of propolis in Algeria. *Industrial Crops and Products*, **53**: 85-92.

Dudonné, S., Poupard, P., Coutière, P., Woillez, M., Richard, T., Mérillon, J. M. et Vitrac, X. (2011). Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **9** (9): 4527- 4536.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

E

EFSA Journal. (2012). *European Food Safety Authority Journal*, **10** (5): 2663.

F

Fakurazi, S., Hairuszah, I. et Nanthini, U. (2008). *Moringa oleifera* Lam prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level. *Food and Chemical Toxicology*, **46**: 2611-2615.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, P. 108-115.

Flament, J. B., Delattre, J. F. et Hidden, G. (1982). The mechanisms responsible for stabilising the liver. *Clinical Anatomy*, **4**: 125-135.

Forouzandeh, H., Azemi, M. E., Rashidi, I., Goudarzi, M. et Kalantari, H. (2013). Study of the protective effect of *Teucrium polium* l. extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. **12** (1): 123-129.

Fournier, P. V. (2010). *Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France*. Paris: Omnibus. P. 750-752.

G

Greenaway, W., Wollenweber, E., Scaysbrook, T. et Whatley, F. R. (1988). Esters of Caffeic Acid with Aliphatic Alcohols in Bud Exudate of *Populus nigra*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **43**: 795-798.

Greenaway, W., English, S. et Whatley, F. R. (1990). Variation in Bud Exudate Composition of *Populus nigra* Assessed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Zeitschrift für Naturforschung*, **45**: 931- 936.

H

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. et Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**: 572-584.

Hennebelle, T., Sahpaz, S. et Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1**: 3-6.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hinson, J. A., Roberts, D.W. et James, L. P. (2010). Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handbook of experimental pharmacology*, **196**: 369-405.

Hogestatt, E. D., Jonsson, B. A. G., Ermund, A., Andersson, D. A., Bjork, H., Alexander, J. P., Cravatt, B. F., Basbaum, A. I. et Zygmunt, P. M. (2005). Conversion of acetaminophen to the bioactive *n*-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *The Journal of Biological Chemistry*, **280** (36): 31405-31412.

I

Ighodaro, M. O., Omole, J. O. et Fadipe, S. O. (2012). Effects of *Piliostigma thonningii* ethyl acetate leaf extract on aluminium-cum extract treated wistar rats. *Animal Research International*, **9** (2): 1579-1584.

J

Jaeschke, H. et Bajt, M.L. (2006). Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicological Sciences*, **89** (1): 31-41.

James, L. P., Mayeux, P. R. et Hinson, J. A. (2003). Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug metabolism and disposition*, **31** (12): 1499-1506.

Jančová, P., Anzenbacherová, E., Papoušková, B., Lemr, K., Lužná, P., Veinlichová, A., Anzenbacher, P. et Šimánek, V. (2007). Silybin is metabolized by cytochrome p450 2c8 *in vitro*. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Journals*, **35** (11) : 2035-2039.

Jerković, I. et Mastelić, J. (2003). Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (Salicaceae). *Phytochemistry*, **63**: 109-113.

K

Kanbur, M., Eraslan, G., Beyaz, L., Silici, S., Liman, B. C., Altınordulu, S. et Atasever, A. (2009). The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mices. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **61**: 123-132.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Karawya, M. S., Ammar, N. M., Hifnawy, M. S., Al-ookbi, S. Y., Mohamed D. A. et El- Aanssary, A. A. (2010). Phytochemical study and evaluation of the anti-inflammatory activity of some medicinal plants growing in Egypt. *Medical Journal Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, **18** (4): 139-150.

Katzung, B. G. (2006). Pharmacocinétique et pharmacodynamie. In: *Pharmacologie fondamentale et clinique*. 9^{ème} éd. Italie : Piccin. P. 36-37.

Kim, H. J. et Vaziri, N. D. (2010). Contribution of impaired Nrf 2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, **298**: 662-671.

Krenkel, O., Mossanen, J. C. et Tacke, F. (2014). Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, **3** (6): 331-343.

L

Larocque, A. (2013). Implications thérapeutiques des différents modes d'intoxication au paracétamol chez l'adulte. In : *Intoxications aiguës*. Paris: Springer-Verlag. P. 179-195.

Laperche, Y. (2003). Les cellules ovales et la régénération du foie. *Médecine sciences*, **19** (6 -7): 697-698.

Lee, Y., Shin, D. H., Kim, J. H., Hong, S., Choi, D., Kim, Y. J., Kwak, M. K. et Jung, Y. (2010). Caffeic acid phenethyl ester-mediated Nrf2 activation and I κ B kinase inhibition are involved in NF κ B inhibitory effect: Structural analysis for NF κ B inhibition. *European Journal of Pharmacology*, **643**: 21-28.

Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J.P., Thérond, P. et Torreilles, J. (1998). Evaluation of lipid peroxidation by assaying the thiobarbituric acid-reactive substances. *Annales de Biologie Clinique*, **56** (3): 305-319.

Liu, Y. T., Lu, B-n. et Peng, J. Y. (2011). Hepatoprotective activity of the total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit in mice treated by paracetamol. *Food Chemistry*, **125**: 719-725.

Luyckx, F. et Scheen, A. J. (1997). Le médicament du mois: Le Legalon® (silymarine) = Silymarine: a novel hepatoprotector. *Revue médicale de Liège*, **52** (12): 792-796.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

M

- Marieb, E. N. (2008).** Le système digestif et le métabolisme. In : *Principes d'anatomie et de physiologie*. 8^{ème} éd. Paris: Pearson Education. P. 524-525.
- Meister, A. et Anderson, M. E. (1983).** Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, **52**: 711-760.
- Menche, N. (2006).** Système digestif, nutrition et métabolisme. In: *Anatomie physiologie biologie*. 3^{ème} éd. Paris: Maloine. P. 340-346.
- Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Drai, J. et Thérond, P. (2008).** Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: aspects analytiques. *Annales De Biologie Clinique*, **66** (6): 605-20.
- Mitchell, S. J., Kane, A. E. et Hilmer, S. N. (2011).** Age-related changes in the hepatic pharmacology and toxicology of paracetamol. *Current Gerontology and Geriatrics Research*, **4**: 1-14.
- Myhrstad, M. C. W., Carlsen, H., Nordström, O., Blomhoff, R. et Moskaug, J. Ø. (2002).** Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radical Biology & Medicine*, **32** (5): 386-393.

N

- Naguib, Y. M., Azmy, R. M., Samaka R. M. et Salem M. F. (2014).** *Pleurotus ostreatus* opposes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in acetaminophen-induced hepatorenal injury. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **14**: 494-506.

O

- Ohkawa, H., Ohishi, N. et Yagi, K. (1979).** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, **95**: 351-358.
- Olaleye, M. T., Amobonye, A. E., Komolafe, K. et Akinmoladun, A. C. (2014).** Protective effects of *Parinari curatellifolia* flavonoids against acetaminophen-induced hepatic necrosis in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **21**: 486-492.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

P

- Pachikian, B., Neyrinck, A., Essaghir, A., Catry, E., De Backer, F., Portois, L., Deldicque, L., Francaux, M., Carpentier, Y., Demoulin, J. B., Cani, P. et Delzenne, N. (2010).** Implication de SREBP-1c dans la stéatose hépatique associée à une carence en acides gras polyinsaturés n-3. *Diabète-lille*, **36**: 1-27.
- Palo, R. T. (1983).** Distribution of birch (*betula* spp.), willow (*salix* spp.), and poplar (*populus* spp.) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, **10** (3): 499-520.
- Pandey, N., Barve, D., Prajapati, N. et Dubey, B. K. (2012).** Evaluation of hepatoprotective activity of ethanolic extract of *Arisaema leschenaultii* blume tuber in paracetamol induced hepatotoxicity in swiss albino mice. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, **3** (1): 312-318.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R. et Defraigne, J.O. (1998).** Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *Medi Sphere*, P. 73-77.
- Poirier, J., Cohen, I. et Bernaudin, J. F. (1975).** Histologie du foie et des voies biliaires. In: *Histologie humaine: Tube digestif foie et voies biliaires pancréas exocrine*. 3^{ème} éd, Paris: Maloine S. A. P. 49-72.

R

- Rahman, I. et MacNee, W. (2000).** Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *European Respiratory Journal*, **16** (3): 534-554.
- Rasheed, R. A., Ali, B. H., et Bashir, A. K. (1995).** Effect of *Teucrium stocksianum* on paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *General Pharmacology*, **26** (2): 297-301.
- Reichl, F. X. (2004).** Médicaments. In: *Guide pratique de toxicology*. 1^{ère} éd. Paris: De boeck. P. 74-75.
- Reid, A. B., Kurten, R.C., McCullough, S.S., Brock, R.W. et Hinson, J. A. (2005).** Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: Role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **312** (2): 509- 516.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Rohnert, U., Koske, D., Schneider, W. et Elstner, E. F. (1998). Inhibition by Salix- extracts and Phytodolor of copper-catalyzed oxidative destruction. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **53** (3-4): 233-240.

Rosenbaum, J., Mavier, P. et Dhumeaux, D. (1991). Interactions cellulaires dans le foie. *médecine/sciences*, **7** (2): 110-117.

Rubiolo, P., Casetta, C., C., Cagliero, Brevard, H., Sgorbini B., et Bicchi, C. (2013). *Populus nigra* L. bud absolute : a case study for a strategy of analysis of natural complex substances. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **405**: 1223-1235.

S

Strain, A. et Diehl, A. M. (2012). Oxydative stress activates hepatic stellate cells. In: *Livre Growth and Repair*. Springer Sciences et Business media. P. 441.

Soliman, M. M., Nassan, M. A., et Ismail, T. A. (2014). Immunohistochemical and molecular study on the protective effect of curcumin against hepatic toxicity induced by paracetamol in Wistar rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **14**: 457-468.

T

Tortora, G. J. et Derrickson, B. (2009). Le maintien du fonctionnement du corps humain. In: *Manuel d'anatomie et de physiologie humaine*. Paris: De boeck. P. 482.

V

Vardar-Ünlü, G., Silici, S. et Ünlü, M. (2008). Composition and *In vitro* antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**: 1011-1017.

W

Warnant, P., Mertens, P. et Marche, C. (2004). Screening of poplar biomass for bio-active compounds: a simple method to assess antioxidant activity. *Bioresource Technology*, **93** (1): 43-48.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Willis, A. L. et Smith, D. L. (1994). Metabolisme of arachidonic acid : An Overview. In: **Cumingham, F. M.** *The hand book of immunopharmacology : Lipide mediators*. Academic Press. P. 1-35.

Wu, K. K. (2005). Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **72** (2): 89-93.

Υ

Yeung, C. K., Shen, D. D., Thummel, K. E. et Himmelfarb, J. (2014). Effects of chronic kidney disease and uremia on hepatic drug metabolism and transport. *Kidney International*, **85** (3): 522-528.

Yu, R., Lei, W., Mandlekar, S., Weber, M. J., Der, C. J., Wui, J. et Kong, A. N. T. (1999). Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase ii detoxifying enzymes by chemicals. *The Journal of Biological Chemistry*, **274** (39): 27545-27552.

Z

Zhang, S., Lu, B., Han, X., Xu, L., Qi, Y., Yin, L., Xu, Y., Zhao, Y., Liu, K. et Peng, J. (2013). Protection of the flavonoid fraction from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Food and Chemical Toxicology*, **55**: 60-69.

Annexes

Annexe 01 :

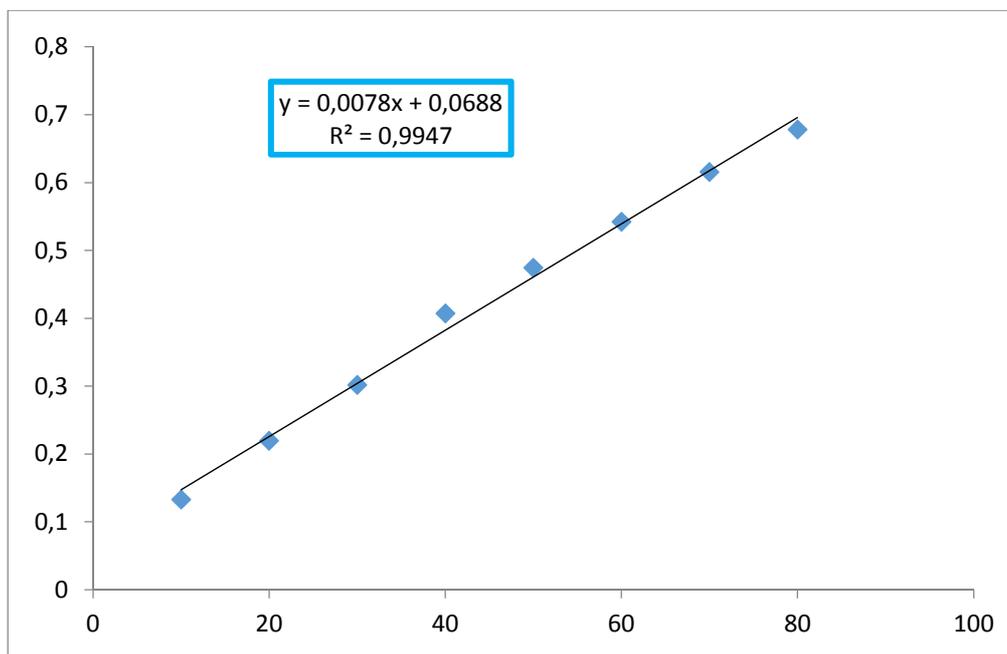


Figure 01: Courbe d'étalonnage du dosage des protéines par la méthode de Bradford.

Annexe 02:

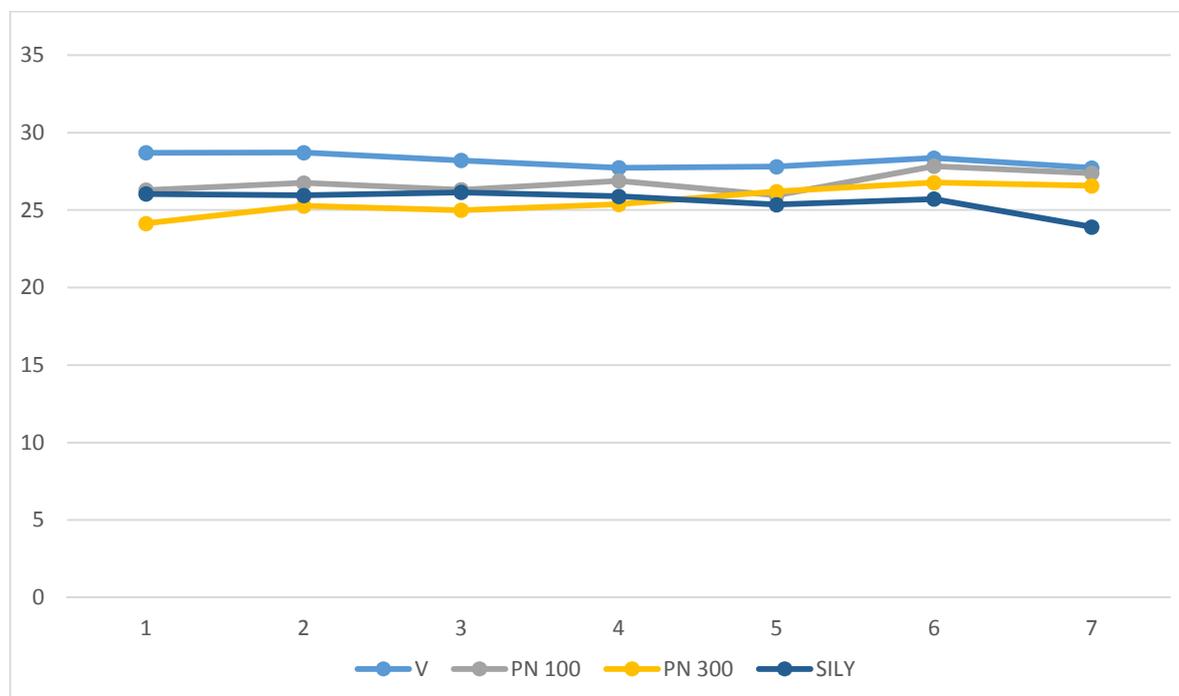


Figure 02: Représentation graphique de la variation des poids des souris durant la période du traitement.

V: Véhicule (CMC 0,8%), PN 100: *P. nigra* 100 mg/kg, PN 300: *P. nigra* 300 mg/kg, SILY: Silymarine.

Résumé

La métabolisation hépatique du paracétamol à forte dose génère avec une grande concentration du NAPQI, métabolite hautement toxique responsable de l'hépatotoxicité. La présente étude porte sur l'évaluation de l'effet hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique de bourgeons de *Populus nigra* (Salicacées) contre une intoxication induite par le paracétamol chez des souris albinos. L'extrait éthanolique a été administré par voie intra-gastrique à des doses de 100 et 300 mg/kg durant 5 jours et la toxicité a été induite par injection intrapéritonéale du paracétamol à 400mg/kg une heure après la dernière dose de l'extrait. La silymarine (100 mg/kg) a été utilisée comme une molécule de référence. Il a été montré que le paracétamol augmente significativement les valeurs sériques d'ASAT ($425,98 \pm 57,40$ UI/L) et ALAT ($144,56 \pm 19,9$ UI/L) ainsi que le taux hépatique du MDA (7.47 ± 0.93 nmol MDA/mg protéines), comparativement au groupe véhicule. Ces résultats ont été confirmés par les lésions hépatiques observées dans les coupes histologiques. Le prétraitement par les doses 100 et 300 mg/kg d'extrait a réduit d'une manière significative les taux d'ASAT, ALAT et de MDA. De plus, l'architecture hépatique normale a été restaurée. Ces résultats suggèrent que l'extrait éthanolique de bourgeons de *P. nigra* possède un effet hépatoprotecteur à faible dose contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol. Par conséquent, l'identification des composés responsables de l'activité testée ainsi que leur mode d'action seraient à envisager dans le but d'une application pharmaceutique.

Mots clés: Paracétamol, malondialdéhyde, peroxydation lipidique, hépatotoxicité, *Populus nigra*, nécrose.

Abstract

Hepatic metabolism of high doses of acetaminophen produces a great concentration of NAPQI, highly toxic metabolite responsible of hepatotoxicity. This study focuses on the evaluation of the hepatoprotective effect of *Populus nigra* buds ethanol extract (Salicaceae) against toxicity induced by acetaminophen in albino mice. The ethanolic extract was administered intragastrically in doses 100 and 300 mg/kg for 5 days and the toxicity was induced by intraperitoneal injection of paracetamol 400 mg/kg one hour after the last dose of the extract. Silymarin (100 mg/kg) was used as a reference molecule. It has been shown that paracetamol significantly increases the serum values of ASAT (425.98 ± 57.40 IU/L) and ALAT (144.56 ± 19.96 IU/L) and the hepatic MDA level (7.47 ± 0.93 nmol MDA/mg protein) compared to that of the vehicle group. These findings were confirmed by liver lesions observed in histological sections. Pretreatment with doses 100 and 300 mg/kg of extract reduces significantly ASAT, ALAT and MDA levels. Moreover, normal hepatic architecture was restored. These results suggest that the ethanol extract of *P. nigra* buds has an hepatoprotective effect at low dose, against hepatotoxicity induced by paracetamol. Therefore, identification of compounds responsible for the activity tested and their mode of action would be to consider for a pharmaceutical application.

Keywords: Paracetamol, malondialdehyde, lipid peroxidation, hepatotoxicity, *Populus nigra*, necrosis.

ملخص

إن الاستقلاب الكبدي لجرعات مرتفعة من الباراسيتامول يؤدي إلى إنتاج كميات كبيرة من ناب كوئي وينتج عن تراكمه التسمم الكبدي. هدف هذه الدراسة هو تقييم تأثير المستخلص الاثنوليك لبراعم الحور الأسود (الصفصافية) ضد التسمم الناجم عن استخدام الباراسيتامول عند فئران تجارب من سلالة الالبينوس. تركز منهجية هذه الدراسة على اختبار فعالية جرعتين مختلفتين من المستخلص 100 و 300 مغ/كغ وذلك بإعطائها للفئران خلال 5 أيام وحقنهم بجرعة واحدة من الباراسيتامول 400مغ/كغ بعد ساعة من اخذ آخر جرعة من المستخلص. خلال هذه التجربة تم استخدام السليمارين 100مغ/كغ كمرجع. أثبتت النتائج أن الباراسيتامول أدى إلى ارتفاع ملحوظ في معدلات كل من اسات ($425,98 \pm 57,4$ ودل)، ألأت ($144,56 \pm 19,96$ ودل) والامديا في الكبد ($0,93 \pm 7,47$ نانومول الامديا/مغ بروتين) مقارنة مع المجموعة السليمة الشاهدة كما تمت برهنة هذه النتائج من خلال دراسة الأنسجة التي أظهرت إصابات حادة في الكبد لكن استهلاك المستخلص (100 و 300 مغ/كغ) قبل حقن الباراسيتامول اظهر انخفاض ملحوظ في مستويات كل من اسات، ألأت، والامديا مقارنة بالمجموعة المصابة بالتسمم الكبدي و هو ما يوافق ما تمت ملاحظته في دراسة الأنسجة. كما أن هذه النتائج هي مقاربة لنتائج السليمارين. لذلك فان هذه الدراسة تشير إلى أن مستخلص براعم الحور الأسود له تأثير فعال ضد التسمم الكبدي الناجم عن الباراسيتامول وبالتالي فان تحديد المركبات المسؤولة عن هذا النشاط و فهم طريقة تأثيرهم مهمة جدا للقدرة على استخلاص مستحضرات صيدلانية

الكلمات المفتاحية: الباراسيتامول، مالونديالدهيد، أكسدة الدم، التسمم الكبدي، الحور الأسود، الموت الغير المبرمج