

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

N° d'ordre :87 /D3C/2018
N° de série :07/BA/2018



Thèse de Doctorat

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle

Domaine : Biotechnologie et Biologie de l'Environnement

Option : Physio-Toxicologie Cellulaire

Présentée et soutenu par:

BAALI Samiya

Intitulé :

L'effet de la plante *Lifago dielsii* sur le stress oxydatif/ nitrosatif et apoptotique hépatocytaire induit par les antituberculeux.

Soutenu le 03/07/2018

Devant le jury :

Président :	Pr. LALAOUI Korichi	Université des Frères Mentouri Constantine1
Directrice :	Pr. AMEDDAH Souad	Université des Frères Mentouri Constantine1
Examineurs :	Pr. BOURICHE Hamama	Université Abbas Ferhat Sétif 1
	Pr. KHELIFI TOUHAMI Fatima	Université des Frères Mentouri Constantine1

Année 2017/2018

Remerciements

Tout d'abord, louage à «Allah » qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long de la réalisation de ce modeste travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Mme S.Ameddah(Prof. Université Constantine1), qui m'a permis de réaliser ce travail dans les bonnes conditions. Je lui témoigne ma profonde reconnaissance pour ses précieux conseils.

Je remercie chaleureusement Mr K. Laalaoui(Prof. Université Constantine1), de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance à Mme H. Bouriche(Prof. Université de Setif) et Mme FZ. Khelifi Touhami(Prof. Université Constantine1), de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements.

Mes remerciements vont également à Mr Menad(Prof. Université Constantine1) pour leur aide et leurs conseils. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma sincère considération.

Ma gratitude s'adresse à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce modeste travail.

Pour finir, je remercie toute ma famille pour son soutien tout le long de cette thèse.

الملخص :

الغرض من هذه الدراسة هو تقييم *in vivo* التأثير المضاد للأكسدة و الوقائي للكبد للمستخلص البوتانولي (*Lifago dielsii* (BELD) ضد سمية دوائين مضادين للسل : إيزونيازيد (INH) و الريفومبيسن (RIF). تلقى ذكور فئران لمدة 14 ب BELD (200 ملغ / كغ)، في نفس الوقت تعالج هاته الحيوانات ب INH (75 ملغ / كغ) و RIF (150 ملغ / كغ). كما أجريت دراسة *in vitro* لاختبار النشاط المضاد للأكسدة لـ (BELD). أدت المعالجة بـ (RIF/ INF)) الى زيادة كبيرة في اينزيمات المصل (LDH، ALP، GPT،GOT) ، اختلال مؤشرات الدهنية (LDL،HDL) والكوليسترول وجليسيريدات الكبد و المصل) وكذلك إختلال مؤشرات الإجهاد التأكسدي- النتروزي الكبدي (LHP،MDA 4HNE ، نيتروسوثيولز، البروتينات الكاربونيلية ، أكسيد النيتريك) مقارنة بالشواهد . وبالمثل، تسبب العلاج بـ (RIF/ INF)) انخفاضا كبيرا في النشاط المضادة للأكسدة لـ: SOD ,CAT,GST,GPX,POD, و معدل GSH الكبدي. من الناحية النسيجية، أحدث (RIF/ INF)) تشحم كبدي حاد. على العكس من ذلك المعالجة بـ BELD حمى الكبد من تأثير المستقبلات النشطة السامة الناتجة من أيض INH / RIF، مما سمح بالحفاظ على وظائف الكبد و إتزان الهيئة التأكسدية للكبد. يبدو من هاته الدراسة *in vivo* أن EBLD يتميز بنشاط مضاد للأكسدة وموقى للكبد هذا يقترن بتأثيره الايجابي على إختزال حدة التشحم الكبدى المحرض بـ (RIF/ INF)) . التأثير المضاد للأكسدة تم إختباره *in vitro* بإستعمال عدة إختبارات :مخلبة جذر °OH و °NO،مخلبة الحديد وإختبار مضاد للأكسدة الليبيدية ، إختبار القدرة الكلية المضادة للاكسدة . أسفرت هذه الدراسة على أن BELD يمتلك قوة كبيرة في مخلبة جذور °OH و °NO وكذلك قدرة ارجاعية معتبرة ومضادة للاكسدة الليبيدية .

في الختام الدراسة المنجزة تأكد فعالية نبتة *Lifago dielsii* التي تعتبر نبتة مستمدة من الطب التقليدي الجزائري . كل هاته النتائج المتحصل عليها تؤكد أيضا القدرة العلاجية للمستخلص البيتانولي لهاته النبتة ، هذا يدل على أن هاته المستخلصات والمركبات الفعالة بيولوجيا يمكن ان تساهم في تطوير مركبات طبيعية جديدة للوقاية من الاصابات الكبدية .

الكلمات المفتاحية :

الايزونيازيد ، ريفومبيسن ، *Lifago dielsii* ، إضطراب تأكسدي ، إضطراب نتروزي ، وقاية الكبد

Résumé

Le but de la présente étude est d'évaluer *in vivo* l'effet antioxydant et hépatoprotecteur de l'extrait butanolique de *Lifago dielsii* (BELD). Les rats mâles adultes *Wistar Albinos* ont été gavés par l' BELD (250 mg / kg) durant une période de 14 jours et simultanément reçoivent un traitement combiné de l'isoniazide (INH, 75mg/kg) et de la rifampicine (RIF, 150mg/kg). Une étude *in vitro* de l'activité antioxydante d'EBLD a été également effectuée. Le traitement combiné de l'INH/RIF induit un dysfonctionnement hépatique qui s'est révélée par ; une augmentation significative du taux des enzymes sériques (ALT, AST, ALP, LDH), perturbation des paramètres de profile lipidique (HDL, LDL, cholestérol et TG hépatique/sérique) et ceux du stress nitroso-oxydatif hépatique (MDA, 4HNE, LHP, nitrosothiols, protéines carbonylées, monoxyde d'azote) par rapport aux témoins. De même, le traitement par INH/RIF a provoqué une réduction significative de l'activité antioxydante de la SOD, CAT, GST, GPx et POD et le taux de GSH au niveau du foie. Histologiquement, la combinaison de l'INH/RIF était capable d'induire une stéatose hépatique sévère. Contrairement, le prétraitement des rats avec l' BELD protège le foie contre les attaques des métabolites toxiques générés par l'INH/RIF, permettant ainsi le maintien des fonctions hépatiques et l'équilibration du statut redox hépatique. Il s'avère, de cette étude *in vivo*, que l' BELD est doté d'une activité antioxydante et hépatoprotectrice avec une action positive sur la restauration de la stéatose induit par l'INH/RIF. L'effet antioxydant de l'EBLD il a été étudiée au niveau *in vitro* par la réalisation des tests tels que : pouvoir réducteur, piégeage du radical hydroxyle (HO°), capacité antioxydant totale, effet chélateur du fer, effet anti -oxyde nitrite (NO°) et Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique. Les résultats obtenus montre que cet extrait possède une forte activité scavenger de radical HO° et de NO° , ainsi que une forte capacité réductrice et inhibitrice de la peroxydation lipidique. En conclusion, l'étude réaliser valide l'innocuité et l'efficacité de la plante *lifago dielsii* qui est une plante issue de la médecine traditionnelle Algérienne .L'ensemble des résultats obtenue soutiennent aussi le potentiel thérapeutique de l'extrait butanolique de cette plante, fournit ainsi la preuve que ses extraits et composés bioactifs peuvent être développés comme un nouveau produit naturel pour la prévention des atteintes hépatique.

Mots clés : Isoniazide, Rifampicine, *Lifago dielsii*., stress oxydatif et nitrosatif, Hépatoprotection.

Summary

The purpose of this study is to evaluate *in vivo* the antioxidant and hepatoprotective effect of the butanolic extract of *Lifago dielsii* (BELD). The adult male *Wistar Albino* rats were force-fed with the BELD (250 mg / kg) for a period of 14 days and simultaneously received a combined treatment of the isoniazide (INH, 75mg / kg) and rifampicin (RIF, 150mg / kg). *In vitro* study of the antioxidant activity of BELD was also performed. Combination treatment of INH / RIF induces hepatic dysfunctions that have been revealed by; a significant increase in the level of serum enzymes (ALT, AST, ALP, LDH), alteration of lipid profile parameters (HDL, LDL, cholesterol, serum TG and hepatic TG) as well as those of hepatic nitroso-oxidative stress (MDA, 4HNE, LHP, nitrosothiols, carbonylated proteins, nitric oxide) compared to the controls. Similarly, treatment with INH / RIF induces a significant reduction in the antioxidant activity of SOD, CAT, GST, GPx and POD and the level of GSH in the liver. Histologically, the combination of INH / RIF was able to induce hepatic steatosis. In contrast, the pretreatment of rats with BELD protects the liver against the toxic effect of metabolites generated by INH / RIF, thereby maintaining liver functions and balancing hepatic redox status. It appears from this *in vivo* study that BELD is endowed with antioxidant and hepatoprotective activity with a positive action on the restoration of INH / RIF-induced steatosis. The antioxidant effect of BELD has been studied *in vitro* by carrying out tests such as: reducing power, hydroxyl radical scavenging (HO°), total antioxidant capacity, iron chelating effect, nitrite anti-oxide effect (NO°) and Inhibition of lipid peroxidation by the ferric thiocyanate method. The results obtained show that this extract has a strong scavenger activity of radical HO° and NO°, as well as a strong reductive and inhibitory capacity of lipid peroxidation. In conclusion, the study realized valid the safety and effectiveness of the plant *lifago dielsii*. Which is a plant resulting from traditional Algerian medicine. The results obtained also support the therapeutic potential of the Butanolic extract of this plant, proving that its extracts and bioactive compounds can be developed as a new natural product for the prevention of liver injuries.

Key words: Isoniazid, Rifampicin, *Lifago dielsii*., oxidative and nitrosative stress, Hepatic steatosis, Antioxidants, Hepato-protection.

TABLEAU DE MATIÈRE

REMERCIEMENTS

RESUMES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

INTRODUCTION.....1

PARTIE 1: BIBLIOGRAPHIE

1. Antituberculeux	5
1.1. Tuberculose et antituberculeux	5
1.2. Pharmacodynamique de INH et RIF	7
1.2.1. Pharmacodynamique de INH.....	7
1.2.2. Pharmacodynamique de RIF.....	7
1.3. Pharmacocinétique de INH et la RIF.....	9
1.3.1. Pharmacocinétique de INH	9
1.3.2. Pharmacocinétique de RIF	10
2. Hépatotoxicité des antituberculeux.....	11
2.1. Tissu hépatique et Hépatocytes	11
2.2. Voies d'activation métabolique de INH / RIF et l' hépatotoxicité	13
2.2.1. Métabolisme de INH et formations de métabolites hépatotoxiques.....	17
2.2.1.1. Rôle de la N-acetyltransferase	19
2.2.1.2. Rôle des amidases	20
2.2.1.3. Rôles de cytochrome P450	20
2.2.1.4. Rôle de la glutathion S -transférases	22
2.2.1.5. Rôle du système peroxydase.....	22

2.3. Mécanismes de l'hépatotoxicité des antituberculeux.....	24
2.3.1. Stress oxydatif/nitrosatif.....	25
2.3.2. Peroxydation lipidique.....	29
2.3.3. Mitochondrie et stéatose.....	32
3. Système antioxydant	34
3.1. Systèmes enzymatiques.....	35
3.2. Systèmes non-enzymatiques	38
3.3. Polyphénols.....	39
3.3.1. Différentes classes de polyphénols.....	40
3.3.1.1. Acides phénoliques.....	42
3.3.1.2. Flavonoïdes	42
3.3.2. Effets biologiques des polyphénols.....	43

PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODES

1. Données sur la plante <i>Lifago dielsii</i>	48
1.1. Récolte et extraction de la plante <i>Lifago dielsii</i>	48
2. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	49
2.1. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante	49
2.1.1. Test du pouvoir réducteur.....	49
2.1.2. Test du piégeage du radical hydroxyle	50
2.1.3. Test de la capacité antioxydante totale	51
2.1.4. Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique.....	51
2.1.5. Effet chélateur du fer	52

2.1.6. Effet anti –oxyde nitrite <i>in vitro</i>	52
2.2. Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité antioxydante et hepatoprotectrice	53
2.2.1. Animaux et désigne d'expérimentation.....	53
2.2.2. Evaluation de la fonction hépatique.....	54
2.2.2.1. Transaminases glutamique-oxaloacétique (TGO)	54
2.2.2.2. Transaminases glutamo-pyruvique (TGP)	55
2.2.2.3. Lactate déshydrogénase (LDH)	55
2.2.2.4. Phosphatase alcaline (ALP)	55
2.2.2.5. Bilirubine totale.....	56
2.2.3. Evaluation du profil lipidique	56
2.2.3.1. Dosage du cholestérol	56
2.2.3.2. Dosage des teneurs en HDL	56
2.2.3.3. Dosage de teneurs en LDL.....	57
2.2.3.4. Dosage des triglycérides sériques.....	57
2.2.3.5. Dosage des triglycérides hépatiques	57
2.2.4. Evaluation <i>in vivo</i> de stress oxydatif.....	58
2.2.4.1. Mesure de taux de la (MDA), le (4-HNE) ,(LHP).....	58
2.2.4.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)	59
2.2.4.3. Mesure de l'activité de la peroxydase (POD)	59
2.2.4.4. Mesure de l'activité de super oxyde dismutase (SOD)	59
2.2.4.5. Mesure l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)	60
2.2.4.6. Mesure de taux du glutathion (GSH)	61
2.2.4.7. Dosage de niveau de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	61
2.2.5. Evaluation du stress nitrosatif hépatique.....	61

2.2.5.1. Dosage du taux d'oxyde nitrique.....	61
2.2.5.2. Dosage du taux de protéines carbonylées	62
2.2.5.3. Dosage du taux de nitrosothiols	62
2.2.6. Mesure de l'activité de la caspase-3.....	63
2.2.7. Dosage de protéines	63
2.2.8. Etude histologique	63
3. Analyse statistique	64

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Activité antioxydante <i>in vitro</i> de l'extrait butanolique de <i>Lifalga dielsii</i> (BELD).....	65
1.1. Pouvoir réducteur.....	65
1.2. Piégeage du radical hydroxyle.....	66
1.3. Capacité antioxydant totale	67
1.4. Inhibition de la peroxydation lipidique	68
1.5. Effet chélateur de fer	70
1.6. Effet scavenger de l'oxyde nitrique (NO°).....	71
2. Effet du BELD sur la fonction hépatique.....	72
2.1. Transaminases (TGO et TGP), ALP, LDH et la bilirubine totale.....	72
2.2. Profile lipidique sérique et hépatique.....	74
3. Effet du BELD sur le statut oxydatif hépatique.....	76
3.1. Marqueurs peroxydatifs hépatique (MDA, 4-HNE, LHP et H ₂ O ₂).....	76
3.2. Effet du BELD sur CAT, POD, SOD, GST ,GPx et GSH).....	78
4. Effet de BELD sur le stress nitrosatif et apoptotique.....	80
5. Effet sur l'histologie du foie.....	82

DISCUSSION.....	86
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	98
RÉFÉRENCES.....	101

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1	49
Figure 1	6
Figure 2	8
Figure 3	11
Figure 4	16
Figure 5	18
Figure 6	23
Figure 7	26
Figure 8	30
Figure 9	31
Figure 10	33
Figure 11	33
Figure 12	35
Figure 13	41
Figure 14	43
Figure 15	44
Figure 16	47
Figure 17	65
Figure 18	66
Figure 19	67
Figure 20	69
Figure 21	70
Figure 22	71
Figure 23	73

Figure 24	75
Figure 25	77
Figure 26	79
Figure 27	81
Figure 28A	82
Figure 28B	83
Figure 28C	84
Figure 28D	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-HNE: 4-hydroxynonenal
AcINH: Acétylsiazoïde
ADN: Déoxyribo-nucleotide
ALP: Alkaline phosphatase
ARNm: ARN messenger
ATP : Adenosine 5'-triphosphate
BELD: Extrait butanolique de *Lifago dielsii*
BSA : Bovine serum albumin
CYP : Cytochrome
DiAcHz: Diacétylhydrazine
DTNB: Acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque)
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
GSH :Glutathion réduit
H₂: Hydrazine
IL : Interleukin
INA : Acide isonicotinique
INH: Isoniazide
LDH: Lactate deshydrogenase
MDA: Malondialdéhyde
MPO :Myeloperoxydase
NAT: trans-N-acyltransférase
NF- κ B: Nuclear factor- κ B
ng :nano- gramme
nM :nano- mole
NO: Monoxyde d'azote
NOO[•] :Peroxynitrite
OH[•] : Radical hydroxylé
RIF: Rifampicine
RNS: Reactive nitrogene species
ROS: Reactive oxygene species
TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances
TNF α : Tumor necrosis factor α

Introduction

L'hépatotoxicité d'origine médicamenteuse couvrent la quasi-totalité des pathologies hépatiques et concernent, à l'heure actuelle, plus de 1100 médicaments Elle peut revêtir tous les aspects de la pathologie hépatique aiguë ou chronique. De nombreux médicaments peuvent être toxiques pour le foie, entraînant chez certains patients des lésions hépatiques graves, voire mortelles (**Teschke and Danan, 2018**). Malheureusement, les mécanismes de cette hépatotoxicité ne sont pas connus pour toutes les molécules incriminées. En revanche, de nombreux travaux expérimentaux ont été réalisés avec quelques médicaments (paracétamol, antituberculeux, acide valproïque, halothane, analogues nucléosidiques antirétroviraux), et ces investigations ont permis d'identifier plusieurs mécanismes d'hépatotoxicité qui peuvent expliquer pourquoi les hépatocytes peuvent subir des dommages parfois irréversibles (**Fromenty, 2010**).

L'isoniazide(INH) et la rifampicine(RIF), deux médicaments de première ligne utilisés dans la thérapie anti-tuberculose, ils sont principalement métabolisés au niveau du foie et ont été connus pour être potentiellement hépatotoxiques. Ils peuvent conduire à une lésion hépatique grave, lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec une incidence de l'hépatite toxique de 1,6% en cas du traitement avec INH seul, 1,1% dans le cas de la RIF seul et 2,5% en cas de la combinaison de l'isoniazide et rifampicine. L'administration combinés du INH/ RIF, produit beaucoup d'aberrations métaboliques et morphologiques dans le foie, du fait que le foie est le principal site de métabolisme pour ces antituberculeux (**Santhosh et al., 2013 ;Wang et al., 2017**).

Malgré le mécanisme indéfini de l'hépatotoxicité par INH (**Sarich *et al.*, 1996 ; Metushi *et al.*, 2016**). L'hydrazine et de l'acétylhydrazin sont considérés comme les principaux métabolites toxiques de l'INH. Ces deux métabolites sont produits par une série d'enzymes, y compris le cytochrome P450. La RIF qui est un antibiotique est considérée comme un inducteur puissant de l'oxydase à fonction mixte, il augmente l'hépatotoxicité de l'isoniazide en améliorant la production des métabolites toxiques de l'acétylhydrazine (**Hoechst, 2000**). Ces médicaments antituberculeux induisent l'hépatite par multiple mécanisme ; le stress oxydatif /nitrosatif et la peroxydation des lipides endogènes sont des facteurs majeur de l'action cytotoxique de l'INH et du RIF. Le dommage oxydatif induit par les médicaments antituberculeux est généralement attribué à une formation excessive des espèces réactives de l'oxygène et l'azote (ROS et RNS) qui agissent comme stimulateurs de la peroxydation lipidique et source de destruction et endommagement de la membrane cellulaire. En outre, des altérations de divers mécanismes de défense cellulaire enzymatique et non enzymatiques étaient impliqués dans hépatotoxicité par l'INH et le RIF (**Tasduq *et al.*, 2005 ; Metushi *et al.*, 2016**).

Les ROS /RNS et les métabolites réactifs produisent au cours du métabolisme des antituberculeux sont détoxifiées par différents systèmes de protection, comme la conjugaison au glutathion et les époxydes hydrolases. Lorsque ces mécanismes sont insuffisants, les métabolites réactifs peuvent se lier de façon covalente sur des constituants des hépatocytes et entraîner la mort cellulaire en interférant avec l'homéostasie cellulaire ou en déclenchant des réactions immunologiques (**Pengcheng *et al.*, 2016**). La toxicité peut être aussi liée à une apoptose de l'hépatocyte ou à des dysfonctionnements mitochondriaux en inhibant directement l'oxydation mitochondriale des acides gras, ou indirectement par inhibition de la chaîne respiratoire. Dans ce cas, le médicament induit une accumulation de triglycérides (stéatose) qui, à long terme, peut évoluer en stéatohépatite (**Church *et al.*, 2014**).

Pour se protéger des effets toxiques des ROS/RNS et des métabolites toxiques des médicaments, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants. En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production des ROS/RNS (**Sahnoun et al., 1998; Hartkoorn et al., 2010**). Aussi Les composés biologiques avec des propriétés antioxydantes contribuent à la protection des cellules et des tissus contre les effets délétères de ces espèces réactives d'oxygène et l'azote et d'autres radicaux libres (**Eidelman et al., 2002**). Les flavonoïdes, importants antioxydants polyphénoliques naturels, sont omniprésents dans le règne végétal et ont été considérés comme des fort protecteurs contre le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et auto-immunes, les troubles neurodégénératifs et les atteintes hépatique (**Zhang et al., 2015; Arts and Hollman, 2005**), ainsi que tous les altérations associés au stress oxydatif (**Ratnam et al., 2006**). A partir de ces données, nous nous sommes intéressés à étudier la plante *lifago dielsii* Schweinj & Muschl qui est une plante endémique du Sahara Algérienne et appartenant à la famille Asteraceae, elle est reconnue par la médecine traditionnelle dans le traitement du diabète mais peu d'études sur elles ont été réalisés à l'heure actuelle.

Notre travail se consacre à évaluation en premier lieu *in-vitro* l'effet antioxydant de l'extrait butanolique de la plante *lifago dielsii* Schweinj & Muschl (BELD) de la famille d'Asteraceae vis-à-vis de nombreux systèmes générateurs des radicaux libres. En second lieu, l'étude *in vivo* du rôle protecteur de cette plante contre l'hépatotoxicité induite par les antituberculeux INH et RIF chez les rats *Albino wistar* et d'explorer les mécanismes possibles cet effet à savoir :

- ✓ l'interaction entre BELD le dysfonctionnement hépatique
- ✓ l'interaction entre BELD et la dyslipidémie
- ✓ l'interaction entre BELD et les stress oxydo- nitrosatif
- ✓ l'interaction entre BELD et la mort cellulaire

Ce manuscrit de thèse est structuré en trois parties, initié par une synthèse bibliographique mettant l'accent sur un rappel de l'anatomie et la physiologie du foie et les antituberculeux, les atteintes hépatique induite par les médicaments et en précision les antituberculeux INH et RIF et finalement un survol bibliographique sur les antioxydants et les polyphénols. La deuxième partie concerne la méthodologie suivie, elle est subdivisée en deux volets : le premier traite l'étude *in vitro* du pouvoir antioxydant de la plante ; le deuxième volet élucide les études *in vivo* du pouvoir antioxydant et hépatoprotecteur de la plante *Lifago dielsii* Schweinj.&Muschl (Asteraceae) contre la toxicité de INH et RIF chez le rat. Le troisième et le quatrième partie de cette thèse exposent l'ensemble résultats obtenus et la discussion et on termine la thèse par une conclusion générale.

BIBLIOGRAPHIE

1. Tuberculose et antituberculeux

La tuberculose humaine est une infection bactérienne chronique contagieuse qui reste une préoccupation mondiale, avec 8 millions de personnes atteintes chaque année et 2 millions de décès. L'incidence de cette maladie est de 11 cas pour 100 000 (OMS, 2016). Elle est due essentiellement à la *Mycobacterium tuberculosis*, ou *Bacille de Koch*, qu'est un germe intracellulaire facultatif, capable de poursuivre un développement lent (cycle de 20 heures) et d'assurer une longue persistance intracellulaire (source de réveil ultérieur) (Bonnaud and Zigani, 2002). Quelques cas sont dus à *Mycobacterium bovis* ou *Mycobacterium africanum*. Cette maladie présente des manifestations très diverses et une ubiquité remarquable.

Des antibiotiques ont été utilisés contre la tuberculose pour la première fois en 1944 après la découverte de la streptomycine. L'utilisation de ce seul agent a mené à la résistance aux antibiotiques qui est toujours un problème majeur (Nathan, 2009). De meilleurs résultats ont suivi le développement du PAS (acide de Para-aminosalicylic). Le PAS était une streptomycine différente d'agent oral. Ensuite plus de traitements efficaces comme l'isoniazide (INH) sont venus en 1950 et demande de règlement avec la rifampicine (RIF) ont suivi (Barry, 2011). Il y a moins de 20 agents avec l'activité contre la mycobactérie Les antituberculeux actuellement disponibles au marché

L'INH et la RIF sont largement utilisées pour le traitement de la tuberculose; Ils tuent plus de 99% des bacilles tuberculeux dans les deux mois suivant l'initiation du traitement (Iseman et Madsen, 1989). Ils sont considérés comme les plus importants antituberculeux de première ligne. En utilisant ces médicaments en combinaison les uns avec les autres, réduit la durée du traitement de la tuberculose de 18 mois à 6 mois (Somoskovi *et al.*, 2001). Bien que les deux médicaments sont très puissants contre le bacille tuberculeux, ils sont potentiellement hépatotoxique (Metush *et al.*, 2016). La **Figure 1** montre la formule détaillée de INH et RIF.

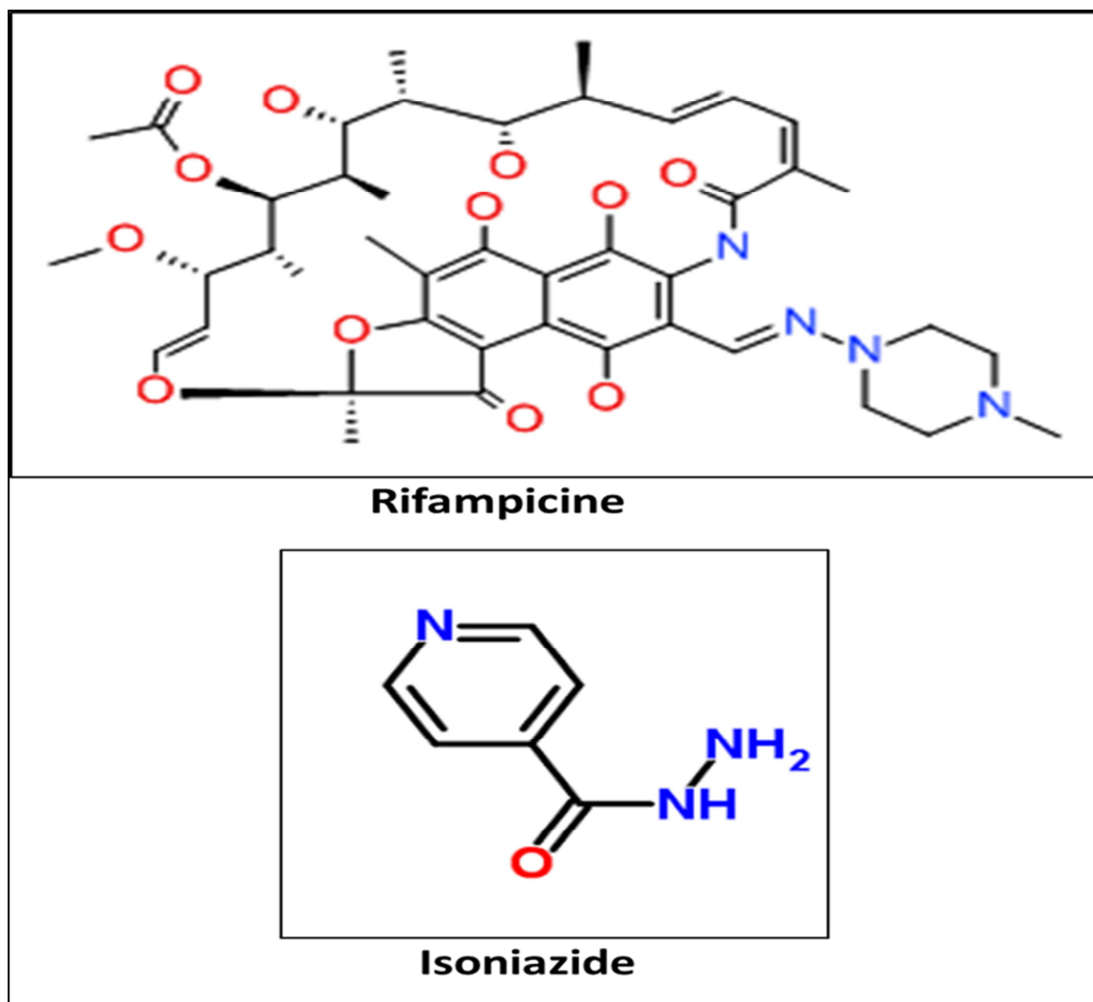


Figure 1 : Structure chimique de la rifampicine et l'isoniazide (Barry, 2011).

1.1. Pharmacodynamique de INH et RIF

1.1.1. Pharmacodynamique de INH

L'INH est l'antituberculeux le plus largement utilisé depuis la reconnaissance de son activité clinique contre *Mycobacterium tuberculosis* au début des années 1950. Il possède une puissante activité bactéricide contre *M. tuberculosis*. C'est une pro-drogue qui est activée par l'enzyme KatG de *M. tuberculosis*, une catalase-peroxydase (Arethusa *et al.*, 2017). La principale cible de l'INH est la protéine InhA, une enoyl-ACP réductase appartenant au système d'élongation des acides gras FAS-II impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques. L'INH inhibe ainsi la synthèse de la paroi mycobactérienne, ce qui entraîne la mort cellulaire (Brossier, 2011).

1.1.2. Pharmacodynamique de RIF

La rifampicine (RIF) est un antibiotique antibactérien de la famille des rifamycines, antituberculeux, dont le mode d'action est la formation d'un complexe stable avec la RNA polymérase des bactéries. L'action bactéricide de la RIF se situe au niveau du génome bactérien par blocage transcriptionnel (Yamori *et al.*, 1992). La RIF se lie de façon covalente à la sous-unité bêta, codée par le gène *rpoB*, de l'ARN polymérase. Cette liaison inhibe l'initiation de la transcription de l'ADN bactérien et la formation de l'ensemble des ARN messagers, des ARN de transferts et des ARN ribosomiaux (Campbell *et al.*, 2001 ; Hartkoorn *et al.*, 2010). Les effets anti-tuberculose de l'INH et la RIF sur la *M. tuberculosis* sont représentés par la **Figure 2**.

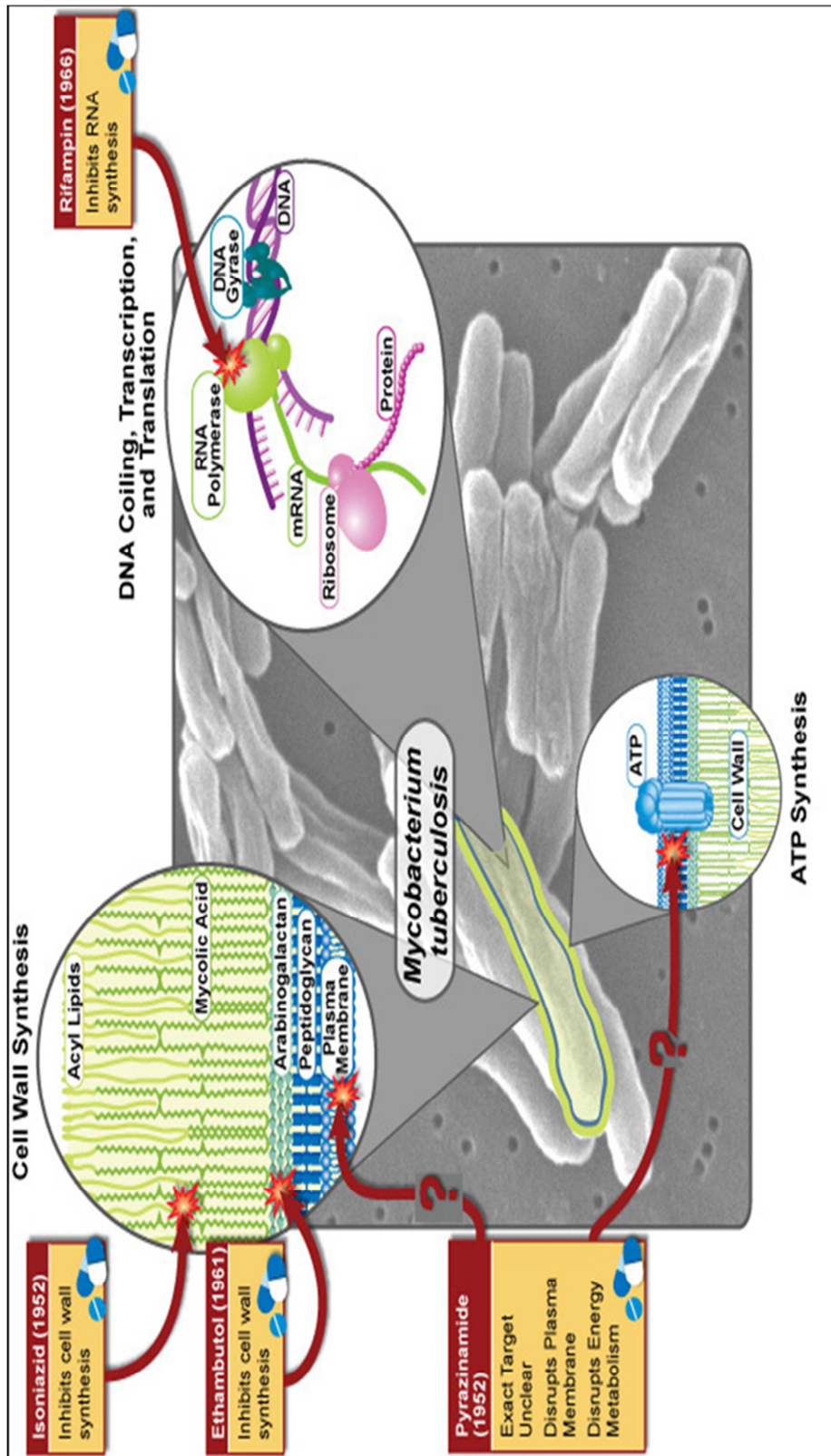


Figure 2: Mode d'action de l'isoniazide et la rifampicine sur les Mycobactéries (Hartkoorn *et al.*, 2010).

2. Pharmacocinétique de INH et la RIF

Les connaissances acquises à la fois dans le domaine de la bactériologie du Bacille de Koch et de la pharmacologie des antituberculeux ont permis de mettre à la disposition du corps médical des antituberculeux très actifs, et une thérapeutique de la tuberculose plus rationnelle. Un traitement correct bien conduit et bien suivi doit aboutir à la négativation durable des examens bactériologiques (plus de 99% de guérisons définitives dans ces conditions).

2.1. Pharmacocinétique de INH

L'INH est un composé à bas poids moléculaire et hydrosoluble qui peut être rapidement absorbé par le tractus gastro-intestinal. Les propriétés pharmacocinétiques de l'INH sont affectées par divers facteurs spécifiques au patient, tels que le statut génétique, l'âge, les comorbidités et la nourriture ou les médicaments co-administrés (**Bhandari and Kaur, 2012**). La concentration plasmatique maximale est atteinte environ 1-3 h après administration du médicament. Après l'absorption, La diffusion de l'INH est excellente du fait de la petite taille de la molécule (**Perriot et al ., 2011**). Il diffuse rapidement dans tous les tissus et fluides corporels, y compris le liquide céphalo-rachidien, la salive, les exsudats pleuraux et péritonéaux, les bronches et les alvéoles pulmonaires (**Thee et al., 2011**). La transformation est réalisée dans différents organes mais essentiellement au niveau du foie par acétylation, le dérivé acétylé est inactif (**Preziosi, 2007**).

L'acétylation est variable selon chaque individu et dépend de la constitution génétique : acétylateurs rapides, acétylateurs lents. Conséquences pratiques : certains effets secondaires sont plus fréquents chez les acétylateurs lents (surdosage). La posologie peut être adaptée selon la vitesse d'acétylation. L'élimination se fait par voie urinaire sous forme active 10 à 30% (suivant le type d'acétylateurs) et par voie biliaire sous forme métabolisée (Wilkins *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2013). Les effets indésirables peuvent dépendre en partie de la vitesse d'acétylation et des antécédents du malade. En général, bonne tolérance vu son index thérapeutique élevé, mais certains troubles sont associés à la prise de INH tel que : troubles digestives, troubles hépatiques, troubles neurotoxiques, réactions allergiques, ...etc (Fromenty *et al.*, 1995).

2.2. Pharmacocinétique de RIF

La résorption de la RIF est bonne par voie orale. Pic sanguin en 2 à 4 heures, si elle est absorbée à jeun et à distance des repas, sinon la résorption est retardée. La fixation aux protéines plasmatiques est de 75%. La diffusion est excellente, sauf dans les organes riches en lipides (système nerveux centrale) et dans les épanchements, mais elle est bonne dans le poumon, suffisante dans le liquide céphalorachidien (Singh *et al.*, 2015). La RIF est un puissant inducteur enzymatique du système microsomal oxydatif hépatique, elle induit son propre métabolisme. Sa demi-vie passe de 6 heures le premier jour d'administration à 3-4 heures au septième jour (Thee *et al.*, 2011). Elle peut augmenter le catabolisme hépatique de certains médicaments associés et compromettre leur efficacité (quelques cas de grossesse survenant malgré une contraception oestro-progestative bien suivie lors de l'administration de rifampicine). La RIF subit une élimination biliaire et un cycle entérohépatique, elle est contre-indiquée en cas d'obstruction complète des voies biliaires (Teixeira *et al.*, 2013).

Elle est donc éliminée par les fèces, l'urine (20%), la salive, les larmes, tous colorés en rouge orangé. Les effets indésirables sont caractérisés par quelques incidents digestifs (nausées, vomissements...). Des accidents hépatiques (pendant le premier mois de traitement, simple modification biologique (augmentation des transaminases ou ictère important) et d'autres incidents telles que les manifestations immuno-allergiques cutanées, les leucopénies et thrombopénies sont observés (**Pengcheng *et al.*, 2016**).

3. Hépatotoxicité des antituberculeux

3.1. Tissu hépatique et Hépatocytes

Le tissu hépatique est organisé en lobules hépatiques regroupant des rangées d'hépatocytes. Le tissu hépatique renferme de nombreux types cellulaires (hépatocytes, cellules endothéliales, Kupffer et stellaire...) selon la **Figure 3**.

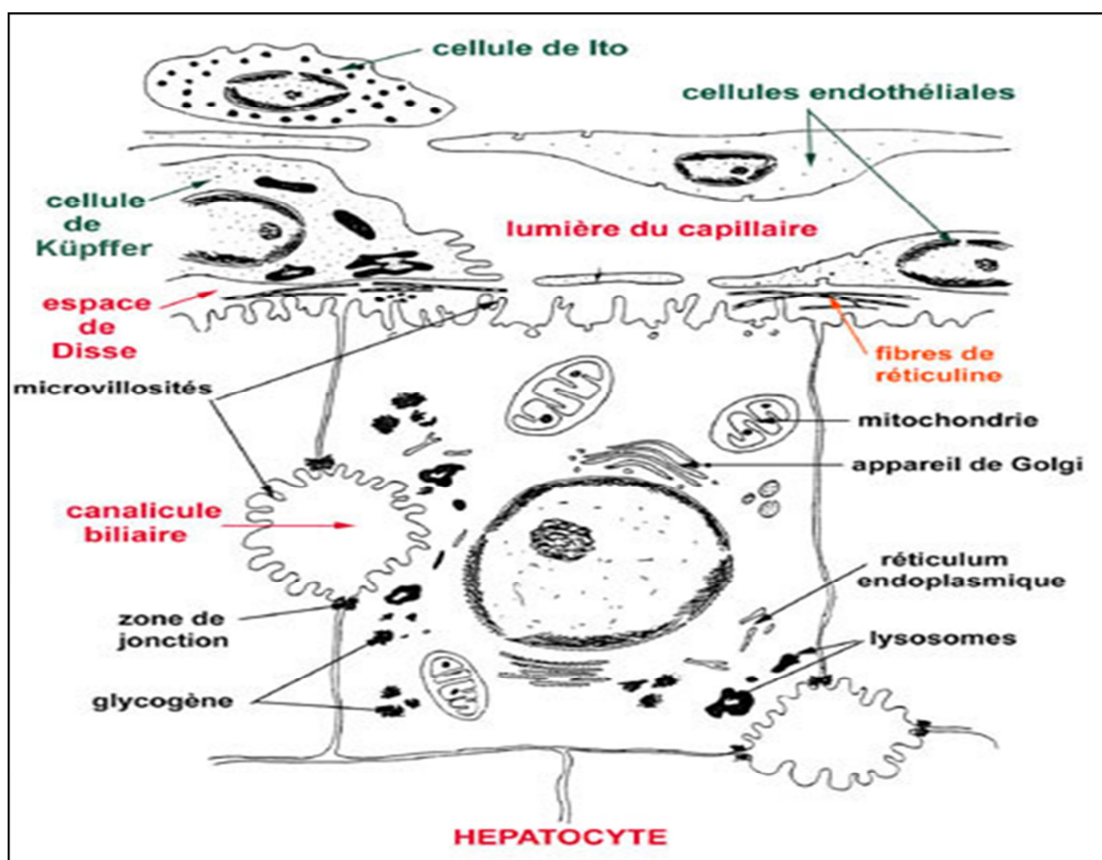


Figure 3 : Différentes cellules du foie (Bedossa, 1992)

✓ **Les hépatocytes** assurent la majorité de fonctions métaboliques du foie. Elles sont de cellules épithéliales polygonales organisées sous forme de travées hépatocytaires le long des sinusoides. En moyenne, le long d'une sinusoides, il y a environ 20 à 30 hépatocytes (**Fausto and Campbell, 2003**). Les hépatocytes possèdent un noyau central, rond et volumineux, et certains sont binucléés. Également, leur cytoplasme est de type éosinophile granuleux puisque très riche en mitochondries et organites intracellulaires (ex: appareil de Golgi et les réticulums endoplasmiques lisse et rugueux). Cette abondance en organites cytoplasmiques reflète une importante activité métabolique (**Berry and Edwards, 2000**).

✓ **Les cellules sinusoidales** sont des cellules endothéliales et représentent environ 20 % de la totalité des cellules. Elles bordent la paroi d'un vaisseau sanguin. Elles sont caractérisées par rapport à d'autres cellules endothéliales par le fait qu'elles ne reposent pas sur la membrane basale et qu'elles sont lâches : cela favorise les échanges entre le secteur sanguin et les cellules hépatiques (**Benahmou, 1993 et Bedossa, 1992**).

✓ **Les cellules de Kupffer** représentent environ 10 % des cellules. Ce sont des macrophages résidents (différent des macrophages qui sont dans la circulation sanguine et qui sont transportés entre les différents organes). Elles ont des attaches avec les cellules endothéliales et restent dans la sinusoides. Elles ont un rôle important pour phagocyter un certain nombre d'agents biologiques qui ont traversé la barrière intestinale (**Bilzer et al., 2006**).

✓ **Les cellules stellaires** ou **cellules d'Ito** représentent environ 5 pour 100 des cellules. Elles stockent des graisses notamment de la vitamine A et ont une fonction physiopathologique. Quand elles sont activées par un processus inflammatoire, elles fabriquent du tissu fibreux (fibrose) qui au niveau du foie est un indicateur de lésion. Sa

progression se traduit par une aggravation de maladie du foie où le stade ultime est la cirrhose hépatique. Ces cellules sont dans des espaces compris entre les cellules sinusoidales et les cellules hépatiques appelé espaces de Disse (**Bedossa, 1992**). Toutes ces cellules contrôlent la composition du sang qui quitte les hépatocytes, la captation des nutriments qui sont prélevés, stockés ou utilisés par les hépatocytes.

3.2. Voies d'activation métabolique de INH / RIF et l' hépatotoxicité

L'hépatotoxicité des antituberculeux est induite par trois mécanismes principaux. Le mécanisme le plus fréquent est la formation de métabolites réactifs qui subissent et engendrent une foule de réactions biochimiques, selon le polymorphisme génétique propre à chaque patient et de nombreux mécanismes sont impliqués, comme la déplétion en ATP ou en glutathion, les liaisons covalentes avec des protéines, lipides ou acides nucléiques (**Tarantino et al ., 2009**). Un deuxième mécanisme implique un dysfonctionnement mitochondrial produisant un excès de radicaux libres qui entraîne la peroxydation lipidique, lésions de la membrane cellulaire (**Berson et al ., 1998**), diminution de l'oxydation des graisses qui est à l' origine d'une stéatose et/ou diminuant la production d'énergie qui est à l'origine d'un dysfonctionnement cellulaire et de la mort cellulaire (**Yew and Leung, 2006**). Un troisième mécanisme implique l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPM) entraînant la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose. L'ouverture du PTPM peut être induite par le médicament lui-même ou par des métabolites réactifs induisant une toxicité directe ou une réaction immunitaire (**Tarantino et al ., 2009**). Ce dernier mécanisme confère aux mitochondries un rôle central dans la toxicité des métabolites réactifs. Ainsi, la plupart des lésions hépatiques médicamenteuses impliquent initialement ou secondairement une atteinte mitochondriale (**Pessayre et al ., 1999**).

Les médicaments antituberculeux sont responsables d'effets indésirables fréquents et potentiellement graves, ce qui nécessite des précautions lors de l'initiation et surveillance lors de la poursuite du traitement. L'hépatotoxicité est l'effet indésirable le mieux connu au cours du traitement antituberculeux associant la rifampicine, l'isoniazide et la pyrazinamide (**Jong-Sun et al. 2015**). Les antituberculeux les plus responsables des atteintes hépatiques sont l'INH et la RIF, et c'est leur association qui augmente le risque d'hépatotoxicité (**Bouchenouf et al., 2011**), qui constitue l'effet secondaire le plus fréquent. Seulement dans les années 1970, l'apparition de lésions hépatiques graves comme un effet secondaire des antituberculeux a été reconnue, entraînant la mort de certains patients (**Teixeira et al., 2013**). Cette hépatotoxicité est favorisée lorsque ces deux médicaments sont utilisés en combinaison avec un taux d'incidence de toxicité hépatique de 2,6% durant la co-administration de l'isoniazide et de la rifampicine, mais seulement 1,1% avec la rifampicine seule et 1,6% avec l'isoniazide seule (**Metush et al., 2016**).

L'administration combinée du INH/ RIF produit de nombreuses aberrations métaboliques et morphologiques dans le foie du fait que le foie est le principal site de détoxification pour ces médicaments antituberculeux (**Santhosh et al., 2007**). Les métabolites bioactifs de l'isoniazide générés par les enzymes métabolisant le médicament, en particulier le cytochrome P450 (CYP) 2E1, qui sont impliqués dans l'hépatotoxicité induite par l'INH chez l'homme (**Teschke and Danan, 2018**), la RIF qui est largement utilisée comme agent antibiotique et un médicament majeur pour le traitement des infections mycobactériennes (**Hoechst, 2000**). Son activité antibactérienne est médiée par l'inhibition de l'ARN polymérase bactérienne. En outre, la rifampicine est considérée comme un inducteur puissant de l'oxydase mixte qui augmente l'hépatotoxicité de l'isoniazide en améliorant la production de métabolites toxiques à partir de l'acétylhydrazine en raison de son induction puissante des enzymes CYP 450 (**Yew and Leung, 2006**).

Selon la **Figure 4**, l'hépatotoxicité induite par l'isoniazide et la rifampicine est dans la plus part des cas elle est de type hépatites aiguës cytolitiques qui semble être joué par les métabolites réactifs, qui s'unissent de façon covalente à des macromolécules indispensables au fonctionnement des hépatocytes, en entraînant la mort cellulaire ou en déclenchant des réactions immunologiques (**Teixeira *et al.*, 2013**).

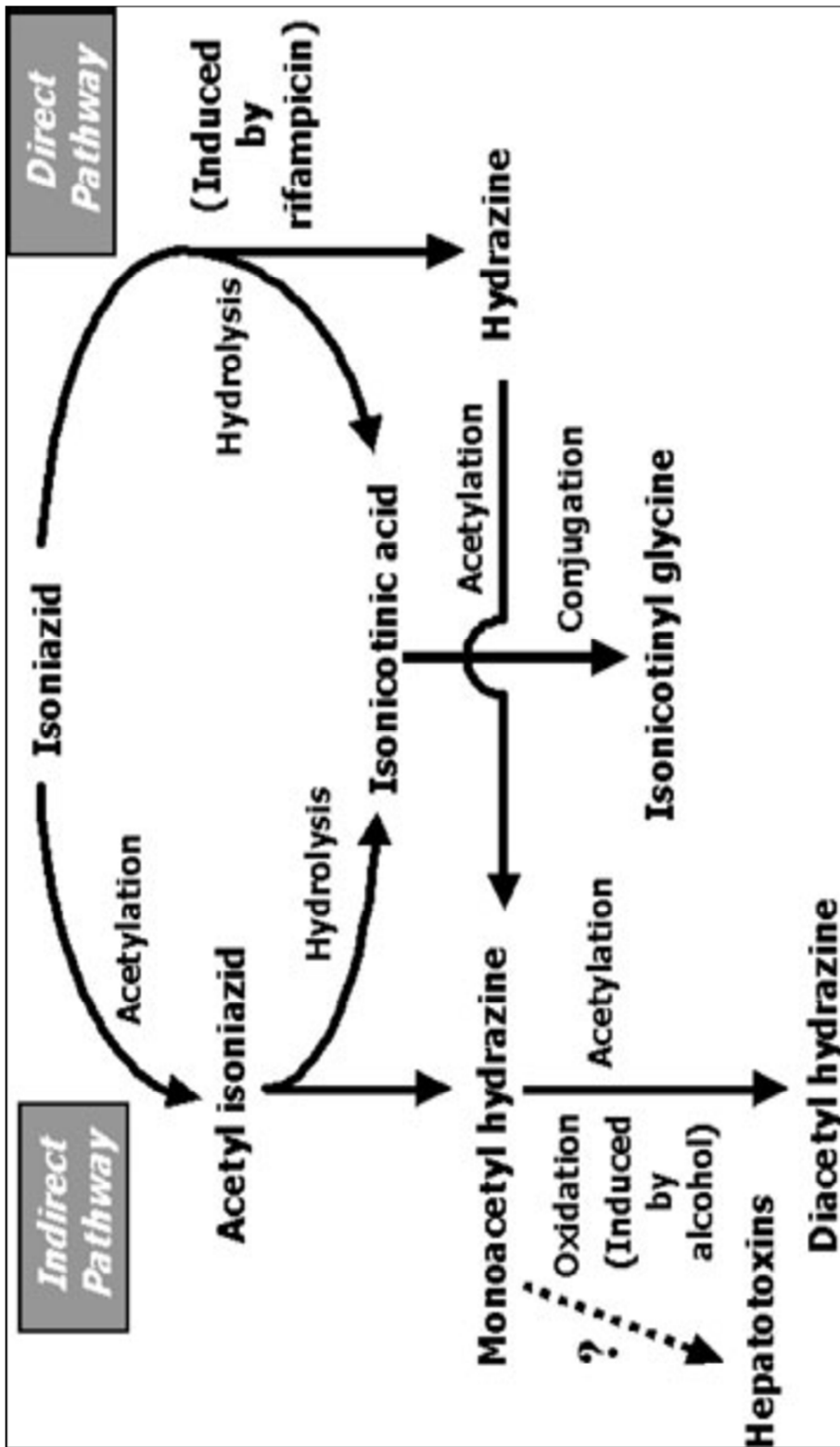


Figure4 : Métabolisme de l'isoniazide et son influence par rifampicine (Teixeira *et al.*, 2013).

3.2.1. Métabolisme de INH et formations de métabolites hépatotoxiques

Les principales voies du métabolisme de l'INH selon **Figure 5** comprennent: (1) l'acétylation pour former l'acétylisoniazide (AcINH) à travers la *N*-acétyltransférase (NAT2) ; et (2) Hydrolyse pour produire de l'acide isonicotinique (INA) et Hydrazine (Hz) par l'intermédiaire de l'amidase. AcINH peut également être hydrolysé pour former INA et acétylhydrazine (AcHz). De plus, le Hz peut être acétylé en AcHz et en diacétylhydrazine (DiAcHz). Hz et AcHz sont supposés être davantage oxydés en métabolites réactifs et impliqués dans l'hépatotoxicité de l'INH, que l'on a proposé d'être médiée par des P450 microsomales, en particulier CYP2E1 (**Teixeira et al., 2013 ; Pengcheng et al., 2016**).

3.2.1.1. Rôle de la *N*-acétyltransférase

Les *N*-acétyltransférases (NATs) constituent une famille d'enzymes, qui comme leur nom l'indique, catalysent le transfert d'un groupement acétyle issu de l'acétylcoenzyme A, sur l'azote du groupement amine primaire (-NH₂) ou hydrazine (-NH-NH₂) d'une molécule aromatique ou arylamine receveuse (**Koen, 2016**). La *N*-acétylation de l'INH est l'exemple le plus connu des polymorphismes génétiques de l'acétylation des médicaments. La capacité d'acétylation est en effet le facteur essentiel qui détermine la concentration plasmatique d'INH, pour une dose donnée. La *N*-acétylation est effectuée par la *N*-acétyltransférase, un enzyme cytosolique qui est principalement présent dans le foie et, à moindre degré, dans la muqueuse de l'intestin grêle (**Rios-Santos and Magno, 2012**). Dans tous les cas, la métabolisation des amines aromatiques et des carcinogènes hétérocycliques par les NATs correspond à une activation ou une détoxification de ces xénobiotiques.

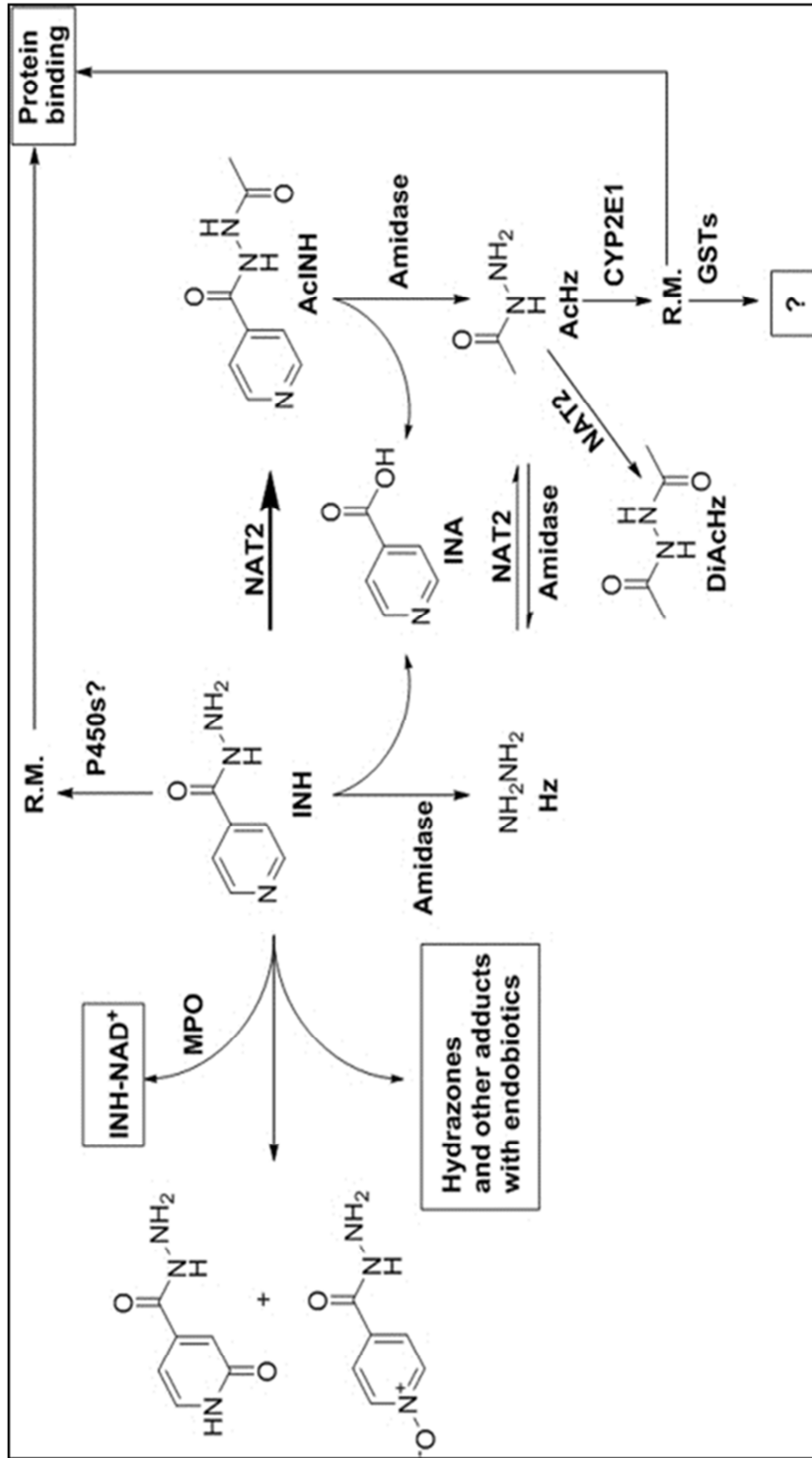


Figure 5: Schéma représentatif du métabolisme de l'isoniazide et les enzymes impliquées (Pengcheng et al., 2016). AcHz: acetylhydrazine; AcINH, acetylisoniazid; DiAcHz: diacetylhydrazine; GST: glutathione S-transferases; Hz: Hydrazine; INA: isonicotinic acid; MPO: myeloperoxidase; NAT2: N-acetyltransferase 2; P450: cytochrome P450; R.M.: reactive metabolite.

Ainsi, la NAT2 catalyse la biodégradation de l'isoniazide pour donner naissance à la *N*-acétylisoniazide (AcINH) qui, à son tour va se métaboliser en acide nicotinique et acétylhydrazine. Ce dernier produit va à son tour subir une série d'acétylations pour entraîner la formation de métabolites réactifs, toxiques pour les cellules hépatiques avec fixation sur les protéines pour donner des adduits aux protéines et des phénomènes d'hépatotoxicité (**Teixeira et al., 2013**). Le polymorphisme génétique de la NAT2 est surtout associé à l'hépatotoxicité médicamenteuse, car la NAT2 étant la principale enzyme impliquée dans le métabolisme de l'isoniazide, est exprimée au niveau du foie. La diminution ou la perturbation de l'activité de la NAT2 pourrait entraîner l'accumulation des précurseurs, tels que l'hydrazine et l'acétylhydrazine dans le foie, conduisant à l'hépatotoxicité de ce médicament (**Zhang et al., 2016**).

3.2.1.2. Rôle des amidases

Les amidases sont une classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des amides et ont habituellement des activités carboxylesterase qui peuvent hydrolyser les esters carboxyliques. Les amidases peuvent directement hydrolyser INH en INA et Hz, et ils peuvent également hydrolyser AcINH et AcHz (**Pengcheng et al., 2016**). Le prétraitement avec un inhibiteur d'amidase, peut inhiber à la fois l'hydrolyse de l'INH et de l'AcINH et diminuer la formation de Hz et AcHz. Les deux Hz et AcHz sont considérés comme des métabolites hépatotoxiques d'INH, donc un niveau plus élevé d'activité amidase peut conduire à la formation croissante de Hz et AcHz et entraîner une incidence élevée d'hépatotoxicité INH (**Sarich et al., 1999**).

3.2.1.3. Rôles de cytochrome P450

Les P450 sont des enzymes majeures de métabolisation du médicament. En outre, ils métabolisent également les molécules endogènes et jouent un rôle important dans l'homéostasie hormonale (œstrogène et testostérone), la synthèse du cholestérol et le métabolisme de la vitamine D. Les CYP3A4, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 sont les principaux P450 impliqués dans le métabolisme des médicaments et catalysent l'oxydation de presque 90% des médicaments humains. Les P450 ont été proposés pour être impliqués dans l'oxydation de Hz et d'AcHz en métabolites réactifs (**Preziosi, 2007 ; Zeruesenay *et al.*, 2001**). INH subit un N-acétyl acétylation catalysée à l'acétylisoniazide. Il est ensuite hydroxylée par les enzymes du cytochrome P450 pour former hépatotoxiques intermédiaire connu sous le nom acetylhydrazine et de l'acide isonicotinique. L'acetylhydrazine est un métabolite capable de former des adduits covalents cellulaires (**Zhai *et al.*, 2008 ; Cai *et al.*, 2016**).

L'acetylhydrazine acétylée à son tour en diacetylhydrazine ou être oxydée par le cytochrome P-450 en un métabolite réactif hépatotoxique. L'oxydation est effectuée par un système microsomal multienzymatique dont l'oxydase terminale est le cytochrome P-450 (**Li *et al.*, 2011 ; Pengcheng *et al.*, 2016**). Cette hémoprotéine est contenue dans de nombreux organes, principalement dans le foie. L'oxydation de la plupart des médicaments est effectuée par un système microsomal multienzymatique dont l'oxydase terminale est le cytochrome P450. Cette hémoprotéine est contenue dans de nombreux organes, principalement dans le foie. Ces isoenzymes ont tous un même centre actif, le fer de l'hème sur lequel se fixe l'oxygène qui va oxyder les substrats. Ces isoenzymes diffèrent cependant par la structure de leurs apoprotéines (**Metushi *et al.*, 2014**). Sous l'effet d'un inducteur enzymatique, on observe, pour certains médicaments, une augmentation d'un effet indésirable particulier, attribuée à l'augmentation de la formation d'un métabolite toxique.

Une augmentation du risque d'hépatotoxicité de l'isoniazide a été observée en cas d'association de l'isoniazide avec un inducteur, notamment la rifampicine (**Zhang *et al.*, 2012**). La rifampicine est un puissant inducteur du métabolisme par les enzymes microsomiales hépatiques, notamment du cytochrome P450 qui transforme le monoacétyl-hydrazine (métabolite de l'isoniazide) en diacétylhydrazine extrêmement toxique. Celui-ci se fixe par des liaisons covalentes sur les macromolécules de la cellule hépatique et provoque une hépatite cytolytique (**Laporte *et al.*, 2002**) .

3.2.1.4. Rôle de la glutathion S -transférases

Les GST catalysent la conjugaison de la forme réduite de glutathion (GSH) à des substrats électrophiles, diminuant ainsi leur réactivité vis-à-vis des macromolécules cellulaires. Dans les voies du métabolisme de l'INH, les GST sont proposées pour détoxifier les métabolites réactifs produits par l'oxydation de Hz et d'AcHz (**Cai *et al.*, 2012**), bien que les métabolites détoxifiés par GST n'aient pas été identifiés. Les polymorphismes de *GST*, en particulier les variantes génétiques de *GSTM1* et de *GSTT1*, ont été étudiés de manière approfondie et sont associés à l'hépatotoxicité de l'INH dans la clinique (**Tang *et al.*, 2013**) . Les génotypes nuls réduisent l'activité catalytique des enzymes GST et donc conduisent à l'accumulation des métabolites toxiques qui peuvent attaquer les macromolécules hépatiques (**Sun and Morgenstern, 1997 ; Pengcheng *et al.*, 2016**).

3.2.1.5. Rôle du système peroxydase

Le système immunitaire joue un rôle capital dans la défense naturelle, mais son activation excessive ou inappropriée peut avoir des conséquences néfastes pour l'hôte. La modulation du système immunitaire (immunomodulation), s'applique à diminuer les réponses excessives ou, à l'inverse, à renforcer les réponses insuffisantes de ce système (**Labro, 2006**). Parmi les agents thérapeutiques qui peuvent interférer avec le système immunitaire, les agents antibactériens sont très étudiés. Le système peroxydase (Myéloperoxydase des neutrophiles,) en présence d'éléments chimiques au caractère électro-négatif et oxydant (iode, brome, chlore), ces enzymes agissent sur le peroxyde (**Pengcheng et al., 2016**).

La formation d'isonicotinyl-nicotinamide adénine dinucléotide (INH-NAD⁺) via la catalase-peroxydase mycobactérienne a été décrite comme le principal composant du mode d'action de l'isoniazide (INH). Cependant, il existe de nombreuses peroxydases humaines qui peuvent catalyser cette réaction. le MPO des neutrophiles est capable de métabolisme de l'INH et de former plusieurs intermédiaires de radicaux libres (**Khan et al., 2016 ; Sarkar et al., 2016**). **Figure 6** montre le rôle de la myéloperoxydase dans le métabolisme de l'INH.

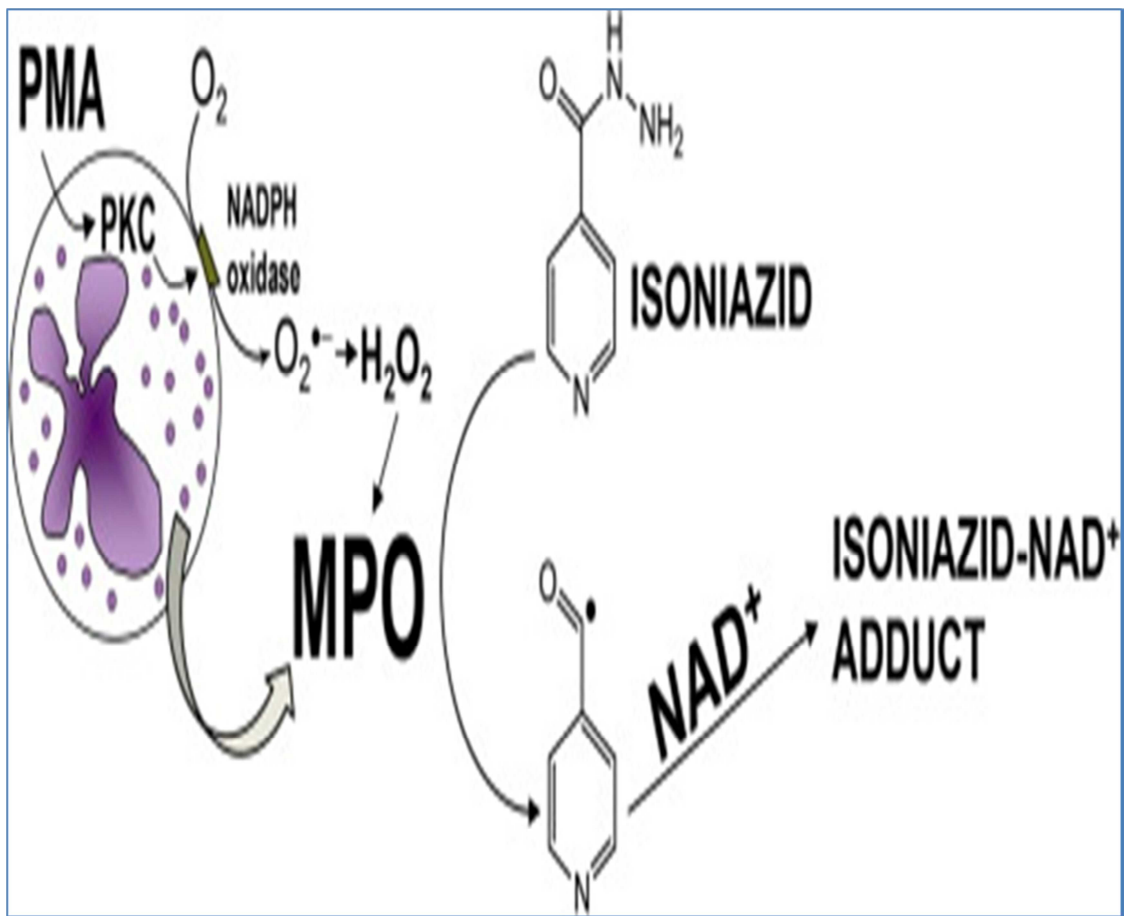


Figure 6: Génération des radicaux libres par le myeloperoxydase(MPO) durant le métabolisme oxydatif du isoiazide(Sarkar *et al.*, 2016).

4. Mécanismes de l'hépatotoxicité des antituberculeux

Après avoir activé et métabolisé par le foie comme il déjà détaillé précédemment, INH et RIF induisent une hépatotoxicité par des mécanismes à plusieurs étapes. Sur le plan biochimiques, l'hépatotoxicité de antituberculeux se caractérise par une chute de la concentration d'albumine sérique et une augmentation de la concentration de sérum globuline, ce qui est lié à la gravité et à la durée de l'atteinte (**Santhosh *et al.*, 2007**).

La RIF, hépatotoxique, mais on sait peu de choses sur le mécanisme de son l'hépatotoxicité. La RIF cause des lésions toxique directe aux hépatocytes (**Shen *et al.*, 2009**) et il augmente considérablement le taux d'acides biliaires sériques chez l'homme (**Berg *et al.*, 1984**). la RIF induite l'inhibition de polypeptide transporteur d'anion organique responsable de l'absorption de l'acide taurocholique a également été démontrée dans des hépatocytes primaires de rat (**Fattinger *et al.*, 2000**). La RIF induit des lésions hépatique de type cholestasique qui sont associer d'une altération de l'intégrité et l'internalisation des jonctions serrées (**Xi Chen *et al.*, 2009**).

L'isoniazide qui est l'antituberculeux le plus incriminé subit une acétylation pour donner le N-acétylisoniazide. Ce dernier est hydrolysé en acétylhydrazine, qui subit par la suite une bioactivation par CYP450 pour donner le radical acétyle (**Metushi *et al.*, 2014**), une espèce réactive détoxiqué par le glutathion. Le mécanisme exact par lequel ce radical réactif induit des dégâts hépatocytaires reste à élucider, de même que les raisons de l'augmentation de l'incidence d'hépatotoxicité quand la thérapie de combinaison est utilisée. Cependant, il a été trouvé que l'hépatotoxicité est accrue par association avec la rifampicine : par un mécanisme d'induction enzymatique (**Perriot *et al.*, 2010**) .

4.1. Stress oxydatif/nitrosatif

Le stress oxydatif/nitrosatif est l'un des mécanismes de lésion hépatique induite par l'INH et RIF (**Sodhi et al ., 1997**). Il correspond à un déséquilibre entre la génération des radicaux et les défenses antioxydantes de l'organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies et altération cellulaire. Le dommage oxydo-nitrosatif médié par les médicaments antituberculeux l'INH et RIF est généralement attribué à la formation des espèces réactif de l'oxygène et l'azote (**Evan et al., 2010 ; Ahadpour et al., 2016**), qui agissent comme stimulateurs de la peroxydation lipidique et la source de destruction et d'endommagement de la membrane cellulaire (**Georgieva et al., 2004**).

En outre, des modifications de divers mécanismes de défense cellulaire constitués de composants enzymatiques et non enzymatiques ont été impliquées dans l'hépatotoxicité induite par l'INH et la RIF (**Tasduq et al., 2005**). Généralement, La majorité de ces radicaux libres formés sont éliminés par l'action d'un glutathion réduit. Dans les cas où il y a une réduction du glutathion cela induit une initiation de la peroxydation lipidique (LPO) et entraînant des lésion tissulaires (**Shanker et al., 2005**). Les entités radicalaires responsables initiateurs du stress oxydatif et nitrosatif sont connus par les espèces réactives d'oxygénés (ROS) et de nitrogène(RNS) respectivement (**Ahmadinejad et al., 2017 ; Lobo et al. 2010**). La **Figure 7** ressemble les différents voies réactionnelles responsables de la formation de ROS et RNS dans un système biologique.

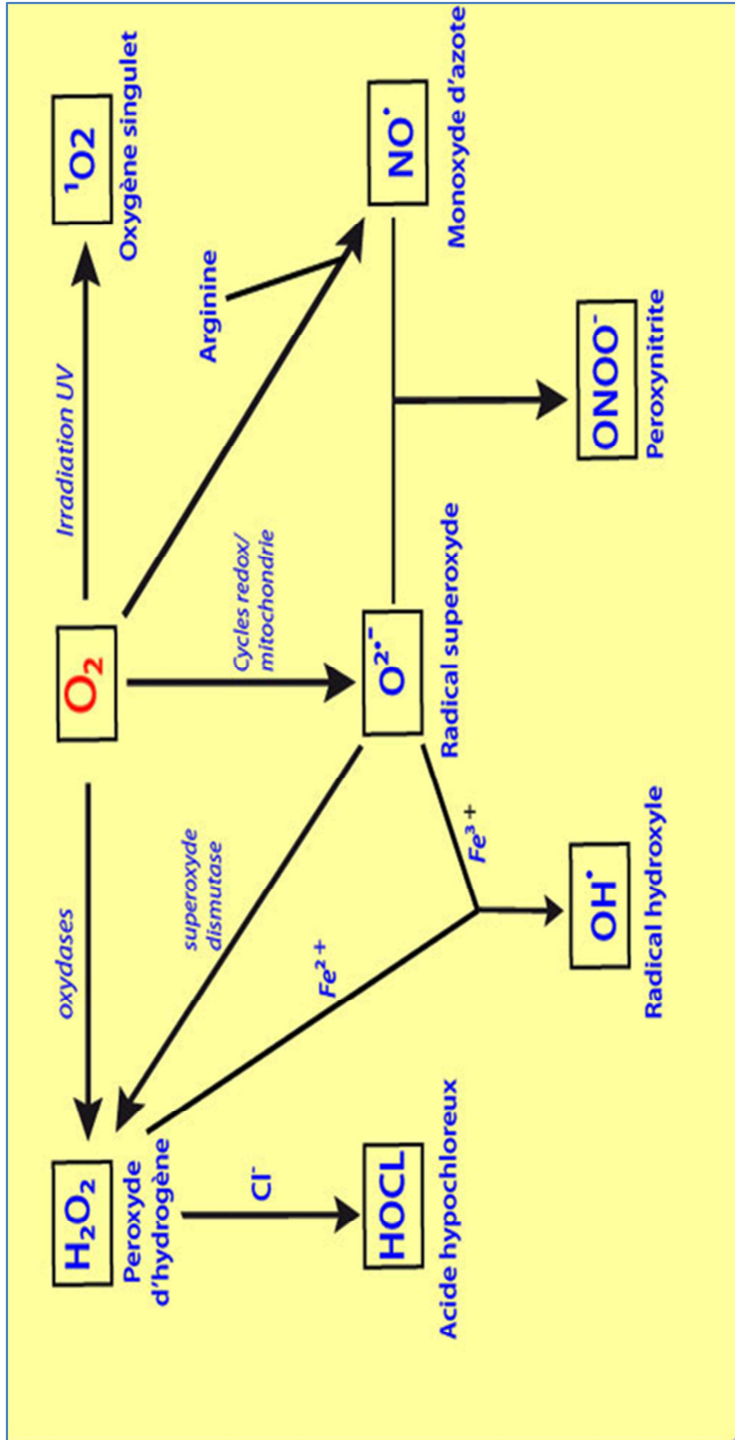


Figure 7: Origine des différents radicaux libres d'oxygène et de nitrogène impliqués en biologie (Sahnoun et al., 1998).

✓ Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS ce sont des molécules ne possédant pas d'électron non apparié mais au fort pouvoir oxydant car elles peuvent donner naissance à des radicaux libres .Il sont hautement produits durant la toxicité par les antituberculeux l'INH et RIF (Teixeira *et al.*, 2013) . Dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire lorsque leur production est aiguë et transitoire, les ROS jouent le rôle de seconds messagers et participent activement à la signalisation cellulaire. C'est quand ils sont produits de manière incontrôlée ou chronique, ou lorsque les défenses anti-oxydantes ne sont pas suffisamment puissantes qu'ils sont à l'origine de stress oxydant (Favier., 2003 ; Poprac *et al.*,2017).

L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de cet $O_2^{\bullet -}$ entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L' H_2O_2 n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production. Selon la réaction de Fenton, l' H_2O_2 se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}), en un ion OH^- et un radical hydroxyle (OH^{\bullet}) [$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$] (Gardès-Albert *et al.*,2015). Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) qui régénère Fe^{3+} en Fe^{2+} selon la réaction d'Haber-Weiss [$O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$]. Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et de fer permet la production de radical hydroxyle (Nimse and Pal, 2015).

L' HO^\bullet , avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène (**Sahnoun *et al.*, 1996**). La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L' HO^\bullet apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS (**Halliwell, 2006**).

✓ Les espèces réactives de nitrogène (RNS)

Ils sont synthétisées à partir du monoxyde de d'azote (NO) et de l'anion superoxyde (principal élément donnant naissance aux espèces réactives d'oxygène ou ROS) donnant lieu au peroxynitrite (ONOO^-), substrat hautement réactif (**Favier, 2003**). La voie principale de synthèse du peroxynitrite est la voie de l'oxyde nitrique synthase 2 induite par les cytokines et l'interféron au niveau des macrophages. Le fonctionnement des RNS et des ROS est intimement lié, et les phagocytes (macrophages et mastocytes) les utilisent afin de détruire les éléments phagocytés. Ils constituent l'un des éléments imitateurs de la durée de vie des phagocytes car ils n'attaquent pas seulement les microbes et les éléments phagocytés mais aussi le phagocyte lui-même. L'utilisation du NO par l'endothélium vasculaire (vasodilatation), provoque la transmutation d'une infime partie du NO en RNS en présence de l'anion superoxyde et toujours sous l'action de l'oxyde nitrique synthase 2 (**Sahnoun *et al.*, 1998**).

Le peroxy-nitrite est un oxydant biologique puissant formé par la réaction de deux radicaux libres, le $O_2^{\circ-}$ et le NO. Il inflige des dommages sévères à la plupart des biomolécules – protéines, lipides et acides nucléiques – par des processus d'oxydation directe ou par la génération secondaire de radicaux libres très réactifs. Lorsque ces dommages atteignent un seuil critique, ils entraînent la mort cellulaire par nécrose ou apoptose. Le glutathion est l'antioxydant le plus actif au peroxy-nitrite et aux autres types de RNS d'où l'importance d'avoir un cycle de glutathion bien fonctionnel (Liaudet, 2017).

4.2. Peroxydation lipidique

Au niveau cellulaire les ROS et les RNS sont capables de provoquer des dommages: une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les ROS initient également l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP). La toxicité aux antituberculeux a été attribuée à la formation des ROS, à la peroxydation lipidique et à une déplétion du système anti-radicalaire endogène (Teixeira *et al.*, 2013). La Peroxydation des lipides endogènes a été montrée pour être un facteur important dans l'action cytotoxique de l'INH et RIF (Santhosh *et al.*, 2007.) Durant cette réaction les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par les ROS et les RNS, qui sont capables d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy (Figure 8). Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Favier., 2003).

Cette réaction fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (**Marnett, 1999**). Après que ces hydroperoxydes subissent plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides, peut libérer différents aldéhydes toxiques. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbituriques (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. La propagation en chaîne de la réaction de peroxydation lipidique est stoppée par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes (**Sahnoun *et al.*, 1998**). Donc, la lipid peroxydation est la conséquence oxydative des attaques des structures lipidiques cellulaires par différentes sources de radicaux libres (**Figure 9**).

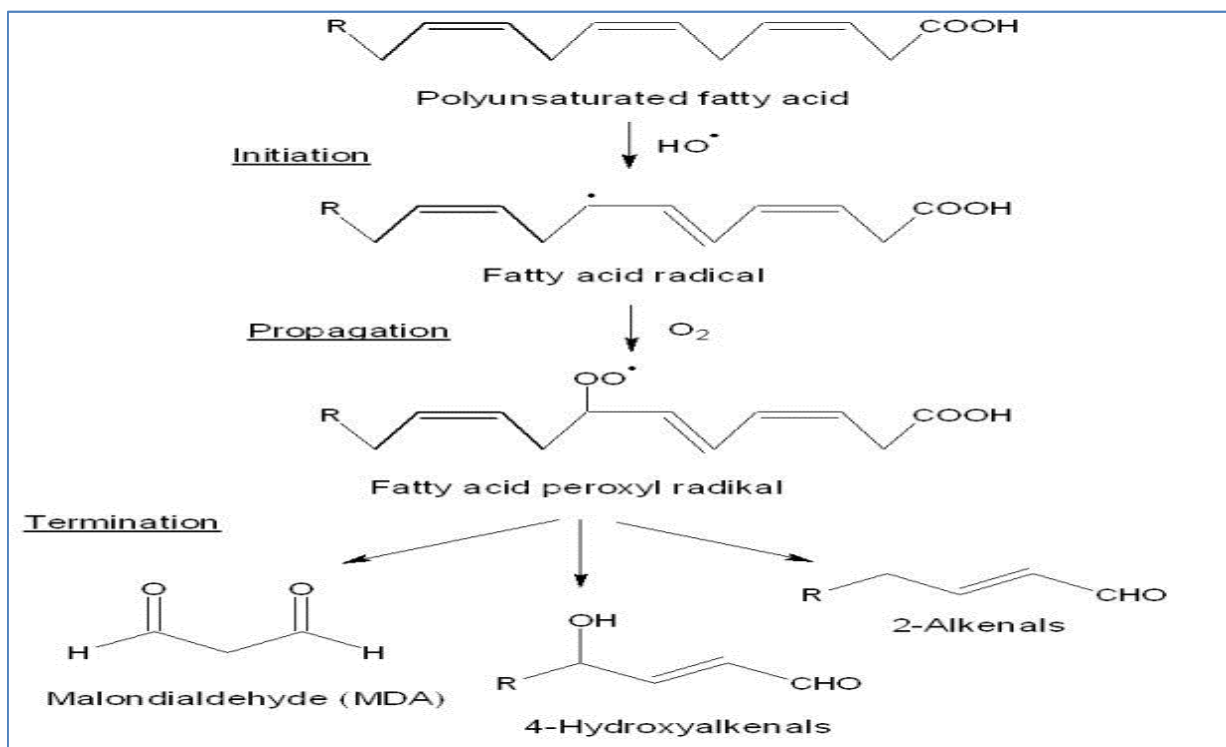


Figure 8 : les réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (Teixeira *et al.*, 2013).

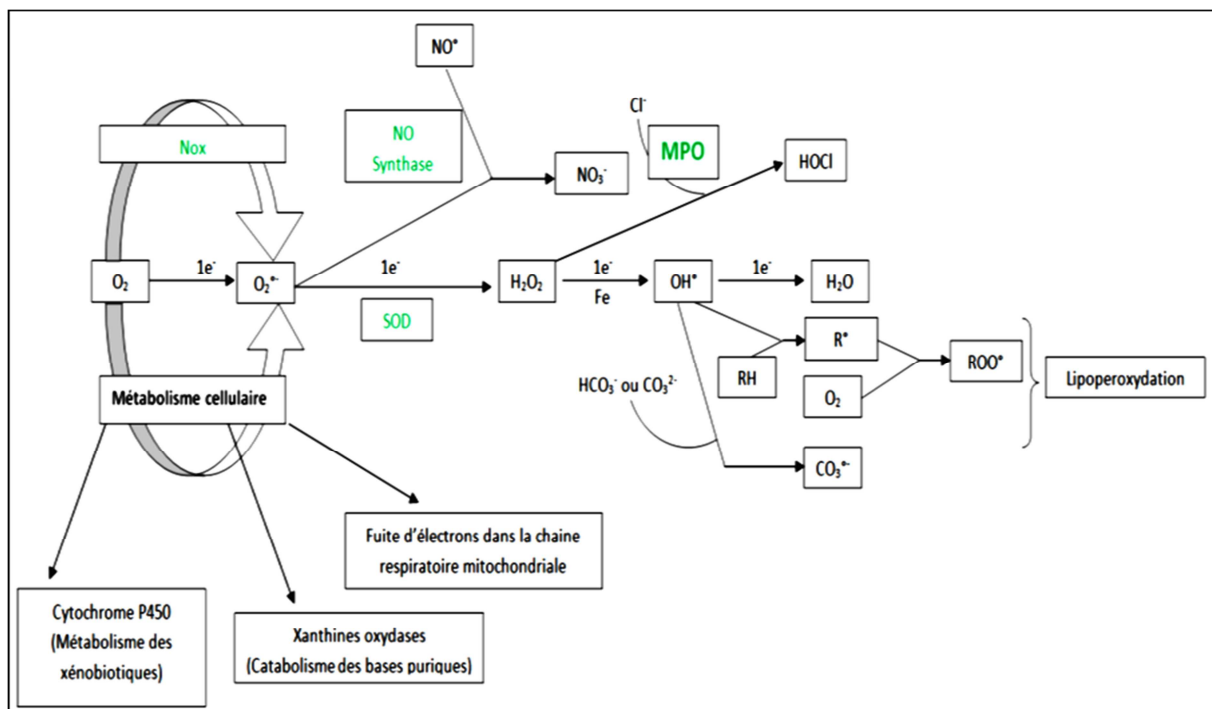


Figure 9 : Ensemble des réactions impliquées dans stress oxydant (Sahnoun *et al.*, 1998).

4.3. Mitochondrie et stéatose

La pathogenèse de l'hépatotoxicité induite par INH/ RIF et le plus souvent induit des changements dans l'histologie du foie avec apparition d'une stéatose et altération des taux des lipides sériques tel que la cholestérol, triglycérides and phospholipids (**Pal et al. , 2008**). Ces altérations sont dues probablement au dysfonctionnement mitochondrial qu'est un mécanisme important de la stéatose induite par les médicaments. (**Fromenty et al. , 2000**). Lorsque la β -oxydation est inhibée, les acides gras s'accumulent dans le cytosol sous la forme de triglycérides émulsifiés provoquant une stéatose typiquement microvésiculaire qui empêche le maintien du noyau au centre de la cellule. Lorsque l'inhibition de la β -oxydation devient chronique, la fusion des microvésicule de stéatose induit une stéatose macrovacuolaire, repoussant le noyau à la périphérie de la cellule (**Fromenty et al., 1995**). En plus de la stéatose, l'inhibition première de la β -oxydation provoque une diminution secondaire de la production d'énergie (**Figure 10**).

En dehors de la perturbation de la β -oxydation dans le foie, les changements de l'état redox mitochondrial sont des événements cruciaux dans la lésion apoptotique des cellules hépatiques dans l'hépatotoxicité INH/ RIF. Des études récente montre les métabolites de INH pourraient déclencher, une perturbation de fonction mitochondriales. Plusieurs arguments font penser que la formation de métabolites réactifs est probablement impliquée dans cette hépatotoxicité directe (**Metushi et al., 2016**). Ces métabolites inhibent l'activité de la chaîne respiratoire qui comprend cinq complexes situés dans la membrane mitochondriale interne, et qui sont des cibles des métabolites toxiques des médicaments (**Berson et al., 1999**). Ce métabolite provoque une chute de synthèse d'ATP et l'ouverture des pores de transition de perméabilité membranaire. Le stress mitochondrial et l'inhibition de la chaîne respiratoire par l'INH (**Figure 11**) expliquent probablement la nécrose hépatique qui s'associe à la stéatose chez les malades recevant ces médicaments (**Lee and Boelsterli, 2014**).

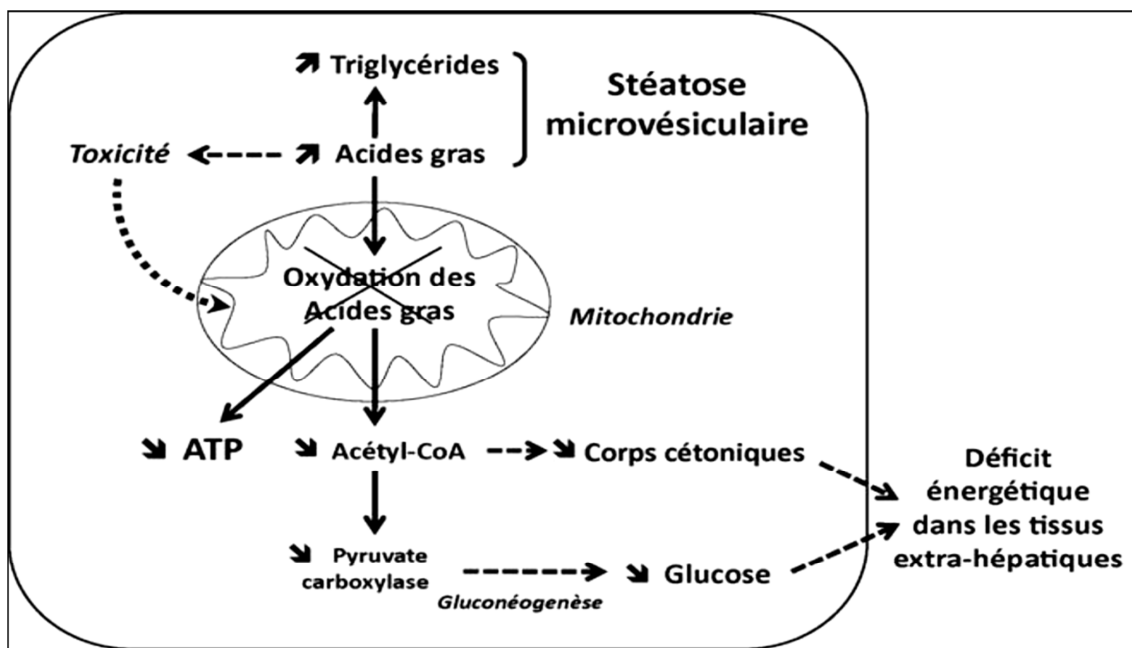


Figure 10 : Conséquences métaboliques de l'altération de la β -oxydation mitochondriale et la genèse de la stéatose hépatique (Fromenty *et al.*, 1995).

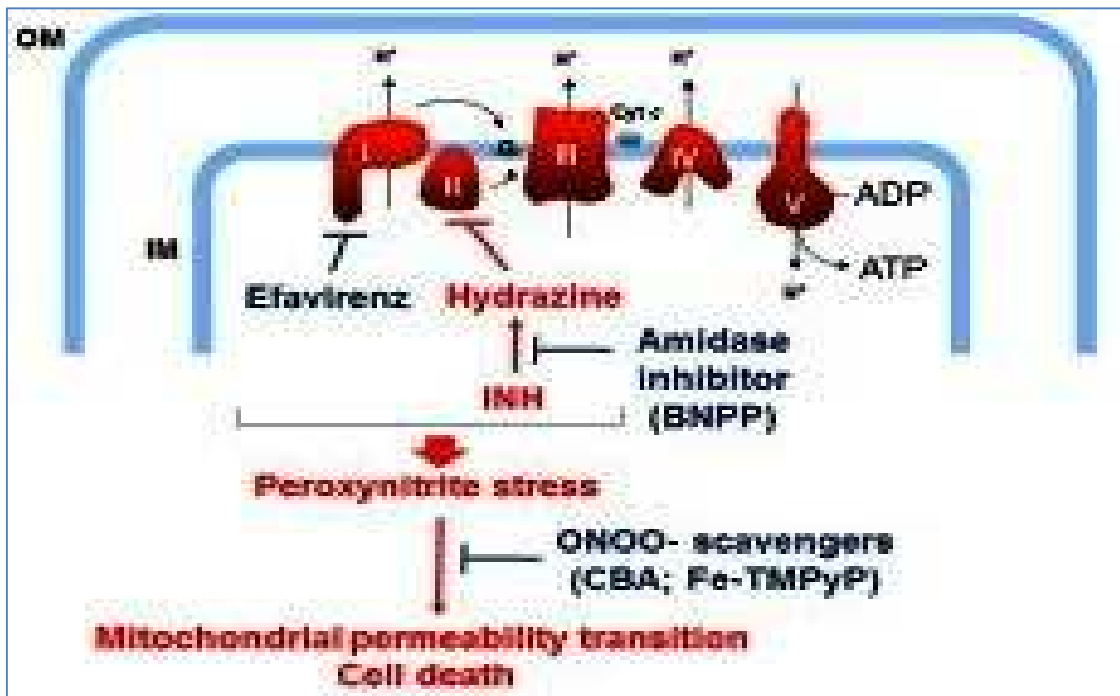


Figure 11 : Altération mitochondriale par l'isoniazide (INH) (Lee and Boelsterli, 2014)

5. Système antioxydant

Depuis que le stress oxydatif a été considéré comme le principal mécanisme de l'hépatotoxicité des antituberculeux ; l'INH et La RIF, les antioxydants pourraient être utilisés comme médicaments anti-hépatotoxiques potentiels pour la prévention des lésions hépatiques causées par ces médicaments (**Sano *et al.*, 2004**). Pour empêcher ces dommages cellulaires, ou les limiter, les organismes ont développé des systèmes de défense antioxydants très complexes faisant intervenir des espèces enzymatiques et non-enzymatiques. Le terme « antioxydant » a été formulé comme « une substance qui en faibles concentrations, en présence du substrat oxydable, ralentit ou empêche significativement l'oxydation des substrats matériels ». **Vansant (2004)** définit les antioxydants comme substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS /RNS.

L'avènement de la biologie moléculaire a montré que les antioxydants sont des molécules qui possèdent des propriétés allant bien au-delà de leur capacité à piéger les ROS /RNS (**Ahmadinejad *et al.*, 2017**). Expérimentalement, il est bien prouvé que les antioxydants présentent des activités anticancéreuses non seulement en piégeant des ROS /RNS mais aussi en augmentant la réponse immunitaire, en diminuant l'expression d'oncogènes ou en inhibant l'angiogenèse des tumeurs (**Shklar *et al.*, 1998**). Ce système antioxydant comporte des enzymes antioxydantes et des molécules antioxydantes dites, antioxydant non enzymatiques.

5.1. Systèmes enzymatiques

Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST). Ce sont des enzymes dont les séquences sont très conservées au cours de l'évolution et qui agissent de manière coordonnée (**Figure 12**). Les enzymes citées ci-dessus constituent les premières défenses antioxydantes ainsi que les défenses auxiliaires qui les soutiennent *via* la régénération du GSH et son transport. Il existe également d'autres défenses antioxydantes telles que les transferrines, les ferritines, les métalloprotéines. Ces dernières sont des enzymes qui en se complexant aux métaux limitent leur disponibilité dans le processus de génération des radicaux libres. Enfin, les enzymes de réparation des molécules endommagées par les ROS peuvent également être considérées comme des défenses antioxydantes (**Halliwell, 2006**).

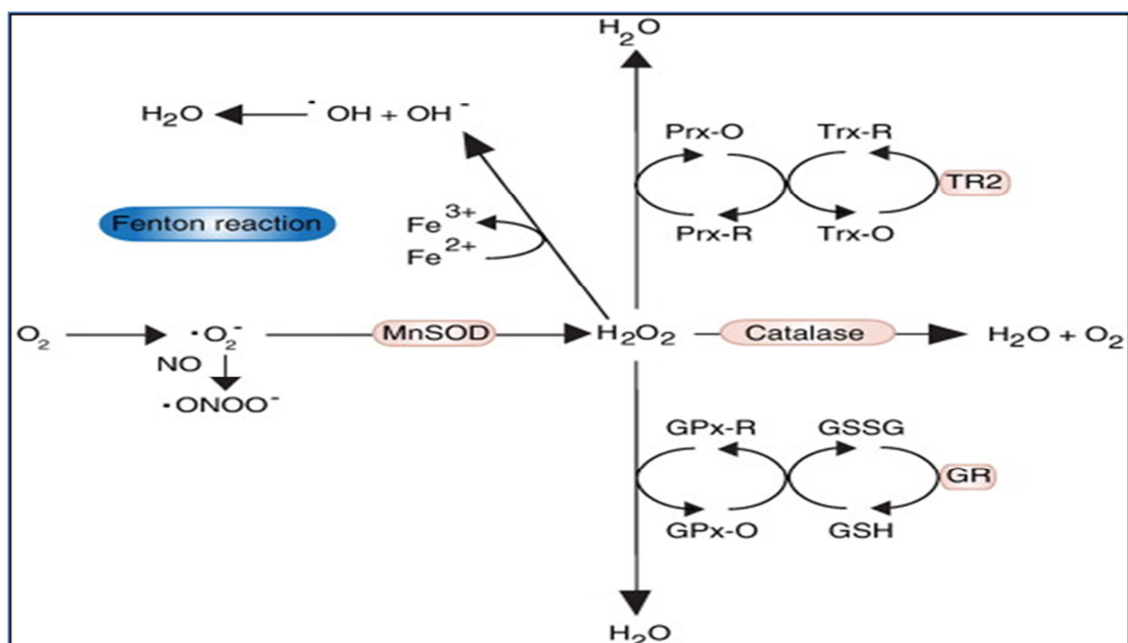


Figure 12 : Coordination entre les antioxydant enzymatiques (**Gardes-Albert *et al.*, 2017**)

✓ **La superoxyde dismutase ou SOD** est une métalloprotéine. Elle existe sous plusieurs formes qui diffèrent par le métal contenu dans leur site actif et leur localisation cellulaire. La SOD accélère la dismutation du radical $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 permettant ainsi à l'organisme un contrôle du taux d' $O_2^{\cdot -}$ Intracellulaire (**Winterboun *et al.*, 1975**). Il existe deux SOD cuivre/zinc (Cu/Zn SOD), les deux sont des dimères, l'une est une enzyme cytosolique et l'autre est une enzyme extracellulaire. Ces deux formes sont retrouvées aussi bien chez les eucaryotes que chez les bactéries. L'ion cuivre est essentiel dans la réaction de dismutation tandis que l'ion zinc est nécessaire au maintien de la structure protéique (**Favier, 2003**). Une troisième forme est la SOD manganèse (Mn-SOD), tétramérique chez les eucaryotes et dimérique chez les bactéries. Chez les eucaryotes, la Mn-SOD est présente dans les mitochondries et permet de protéger celles-ci des radicaux O_2° qu'elles génèrent. Il est estimé qu'elle représente environ 1 à 10% de l'activité SOD totale chez les mammifères. Une quatrième forme est la Fe-SOD qui est une SOD uniquement procaryotique. Les SOD sont en général les premières défenses enzymatiques contre les ROS (**Gardes-Albert *et al.*, 2017**).

✓ **La catalase ou CAT** est une enzyme tétramérique contenant un groupe hème qui catalyse, d'où son nom, la décomposition du H_2O_2 en H_2O et O_2 . La catalase est présente dans la plupart des organismes eucaryotes ou procaryotes. L'activité catalase est réduite par certaines conditions notamment lors de stress thermiques ou osmotiques (**Scibior *et al.*, 2006**). De hauts niveaux de H_2O_2 intracellulaires entraînent une activation préférentielle de la catalase tandis que de plus faibles niveaux seraient préférentiellement pris en charge par la GPX. Ces mécanismes redondants deviennent ainsi complémentaires (**Favier, 2003**).

✓ **La glutathion peroxydase ou GPX** est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H_2O_2 . Elle agit plus lentement que la catalase mais elle a une meilleure affinité pour le H_2O_2 que cette dernière. La GPX est donc essentielle à la décomposition du H_2O_2 produit de manière continue et à des niveaux physiologiques dans la cellule (**Sahnoun et al., 1998**). Les GPX sont des enzymes sélénium-dépendantes ou sélénium-indépendantes et sont soit cytosoliques, comme c'est le cas de la première GPX identifiée, soit extracellulaires. Les GPX permettent la décomposition de H_2O_2 par l'oxydation de son co-substrat le GSH en GSSG qui sera réduit par la suite par l'action de la glutathion réductase (**Gutteridge and Halliwell, 1999**).

✓ **La glutathion réductase ou GR** n'est pas une enzyme antioxydante à proprement parler dans le sens où elle n'a pas d'action directe sur les ROS. En revanche, elle a un rôle très important dans réduction du glutathion, puissant antioxydant et co-substrat de la GPX. Elle fut identifiée la première fois chez les plantes puis chez les animaux (**Gardès-Albert et al., 2016**). La GR permet la régénération du glutathion sous sa forme réduite *via* la consommation de NADPH, évitant ainsi la synthèse *de novo* du glutathion qui présente un coût énergétique plus élevé, dû à la consommation d'ATP (**Favier, 2003**).

✓ **La glutathion S-transférase ou GST** a également une action indirecte sur la détoxification des ROS puisqu'elle permet le transport du GSH vers les compartiments cellulaires subissant des dommages oxydatifs (**Halliwell, 2006**). Elle permet la liaison du GSH à certains xénobiotiques ainsi qu'aux aldéhydes issus de la peroxydation lipidique. La GST a donc un rôle de transport intermembranaire, de liaison et de détoxification des cellules. Avec la GR et la GPX, elle joue un rôle central dans la détoxification des ROS par le GSH (**Montero et al., 2012**).

5.2. Systèmes non-enzymatiques

Les principaux antioxydants non-enzymatiques sont le glutathion, la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et l'acide urique. Ces molécules interrompent la chaîne de réaction radicalaire.

✓ **Le glutathion** (GSH sous sa forme réduite) est un tri-peptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : -L-Glutamyl-L-cystéinylglycine. Sa synthèse fait intervenir la glutamylcystéine synthétase et la glutathione synthétase. Il est particulièrement important car c'est le substrat de plusieurs enzymes antioxydantes. Il peut également régénérer la vitamine E (**Ahmadinejad et al., 2017**.) et réagir avec les radicaux HO° et O_2° directement et ainsi casser la chaîne d'oxydation. Il se présente alors sous la forme d'un radical GS. et se lie à une autre molécule de glutathion radicalaire pour former le glutathion oxydé sous forme disulfide GSSG. Le ratio GSH/GSSG est souvent utilisé comme marqueur du niveau d'oxydation d'une cellule. La maintenance d'un niveau élevé de glutathion est donc essentielle pour prévenir d'éventuels dégâts oxydatifs (**Mati et al., 2016**).

✓ **Les vitamines** sont principalement la vitamine E et la vitamine C.

La vitamine E particulièrement α -tocophérol, est un antioxydant liposoluble. De ce fait, elle est capable d'empêcher ou d'arrêter la propagation de la peroxydation lipidique. Elle réagit directement avec les ROS dérivés des acides gras polyinsaturés ou d'autres molécules radicalaires et devient elle-même une espèce radicalaire αToc avant d'être de nouveau réduite de manière non-enzymatique par les caroténoïdes par exemple. La vitamine E est produite dans les chloroplastes des plantes, en revanche les animaux doivent la trouver dans

leur alimentation. Sa concentration est assez faible dans les membranes dans la mesure où elle est continuellement recyclée en sa forme réduite (Pham-Huy , 2015).

La vitamine C est une molécule soluble dans l'eau. Elle est synthétisée par les plantes et la plupart des animaux, excepté chez certains mammifères tel que l'homme. C'est une molécule antioxydante capable de réagir directement avec tous les ROS réduisant ainsi la peroxydation lipidique et les dommages aux protéines et à l'ADN. La vitamine C a également un pouvoir antioxydant indirect en recyclant les caroténoïdes et la vitamine E. D'un autre côté, la vitamine C permet le recyclage de Fe^{3+} en Fe^{2+} favorisant ainsi la réaction de Fenton et a donc de manière indirecte une action pro-oxydante (Malti *et al.*, 2016).

5.3. Polyphénols

Toutes les défenses endogènes peuvent être renforcées par des apports exogènes en polyphénols et flavonoïdes (quercétine, rutine, resvératrol, pycnogénol) qui se retrouvent en grande quantité dans le vin rouge, le thé vert, les légumes et dans des extraits de *Ginkgo biloba*, de myrtille et d'algues marines (Aviram and Fuhrman., 2002). Les polyphénols sont des micro-constituants végétaux abondants dans nos aliments. Ces composés sont reconnus pour leur forte bioactivité qui se traduit au niveau de l'organisme par une large gamme de propriétés biologiques, potentiellement intéressantes pour contribuer aux effets santé des produits végétaux. Ils sont des métabolites secondaires synthétisés par l'ensemble des végétaux. Ils sont présents dans les vacuoles des tissus, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (Han *et al.*, 2017).

Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement. Ils se caractérisent par la présence de groupements phénoliques (présence d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles sur un cycle benzénique) dans leur structure (Sherine *et al.*, 2016).

5.3.1. Différentes classes de polyphénols

Les plantes consommées par l'homme fournissent plus de 8000 composés phénoliques classés en différentes familles selon la nature de leur squelette carboné. Les polyphénols ont été classés par leur source d'origine, leur fonction biologique et leur structure chimique. En outre, la majorité des polyphénols dans les plantes existent sous forme de glycosides avec différentes unités de sucre et sucres acylés à différentes positions des squelettes de polyphénols (Nimse and Pal, 2015).

On distingue les acides phénoliques (C6-C1 et C6-C3), les flavonoïdes (C6-C3-C6), les lignanes (C6-C3-C3-C6) et les stilbènes (C6-C2-C6). Les polyphénols sont répartis de façon ubiquitaire dans les fruits et légumes qui en constituent les principales sources alimentaires, avec de fortes variations selon les espèces. Ainsi, la concentration en polyphénols totaux peut varier de 140 mg/kg de poids frais pour la pomme de terre à 5,5 g/kg poids frais pour la cerise (Scalbert *et al.* 2005). La classification des polyphénols selon les structures chimiques des aglycones est reportée dans la **Figure 13**

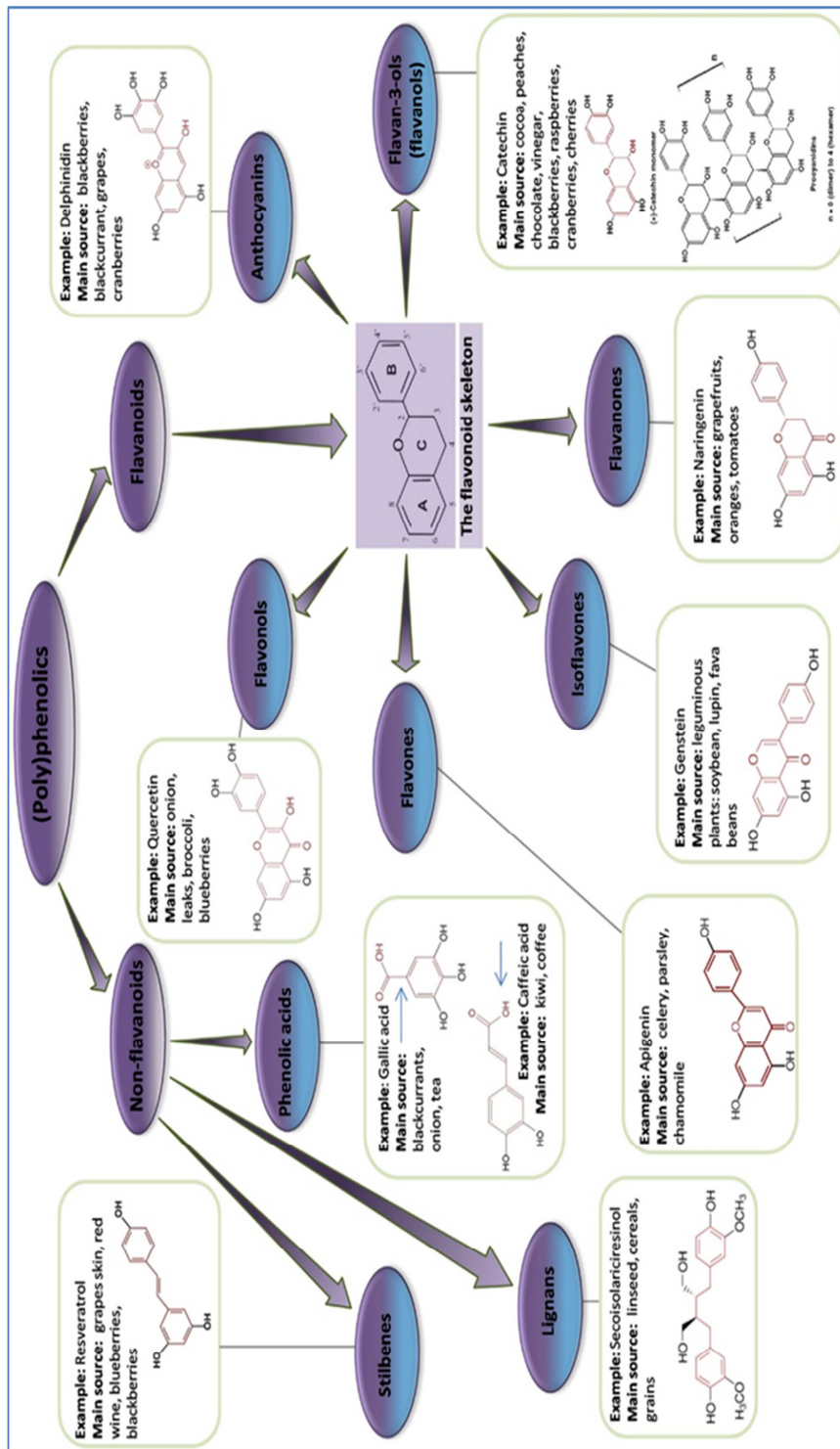


Figure 13 : Différents classes de polyphénols (Sherine et al., 2016)

5.3.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés polyphénoliques non flavonoïdes qui peuvent être divisés en deux types principaux, l'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique à base de squelettes C1-C6 et C3-C6. Les en trouve en abondance dans les fruits et les légumes, dans les grains. Les acides phénoliques sont souvent sous la forme liés. Ces acides phénoliques ne peuvent être libérés ou hydrolysés que par hydrolyse acide ou alcaline, ou par des enzymes (Brunton, 1999 ; Pandy *et al.*, 2009).

5.3.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont le squelette structurel général C6-C3-C6 dans lequel les deux unités C6 (anneau A et B) sont de nature phénolique (**Figure 14**). En raison du motif d'hydroxylation et des variations dans le cycle du chromane (anneau C), les flavonoïdes peuvent être divisés en différents sous-groupes tels que les anthocyanines, les flavan-3-ol, les flavones, les flavanones et les flavonols. Alors que la grande majorité des flavonoïdes ont leur anneau B attaché à la position C2 de l'anneau C, certains flavonoïdes tels que les isoflavones et les néoflavonoïdes, dont l'anneau B est connecté aux positions C3 et C4 de l'anneau C respectivement (Nimse *et al.*, 2015). Les chalcones, bien que dépourvus de l'anneau hétérocyclique C, sont toujours classés comme membres de la famille des flavonoïdes. Ces structures basiques des flavonoïdes sont des aglycones; cependant, chez les plantes, la plupart de ces composés existent sous forme de glycosides (Tsao., 2003). Les activités biologiques de ces composés, y compris l'activité antioxydante, dépendent de la différence structurelle et des modèles de glycosylation.

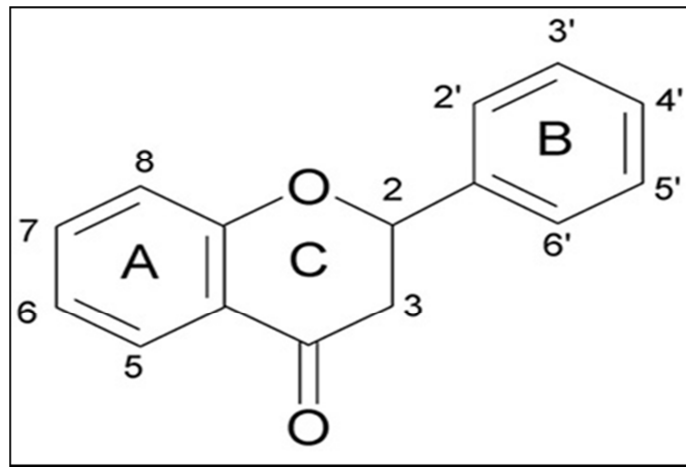


Figure 14 : Squelette de base des flavonoïdes (Tsao., 2010)

5.3.2. Effets biologiques de polyphénols

Des effets protecteurs de la consommation d'aliments riches en polyphénols vis à vis de différentes pathologies (cancers, ostéoporose, maladies cardiovasculaires, diabète...) ont été mis en évidence tant d'un point de vue épidémiologique qu'expérimental (**Figure 15**). De nombreuses études se sont penchées sur l'analyse du mode d'action des polyphénols au cours de ces pathologies. Les altérations oxydatives de molécules telles que les lipides, les protéines ou l'ADN sont impliquées dans de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer, les phénomènes inflammatoires, le diabète. Un antioxydant biologique se définit comme une substance qui, lorsqu'elle est « présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat » (**Halliwell, 2006**).

L'effet antioxydant des fruits et légumes est dû en partie à des micronutriments tels que les polyphénols, les vitamines C et E, les caroténoïdes... (**Rice-Evans *et al.* 1995**). Cet effet antioxydant avait en partie été suggéré dans les années 90 à la suite d'études épidémiologiques montrant une corrélation inverse entre la prévalence des maladies coronariennes dues à une consommation élevée d'acides gras saturés et un régime méditerranéen associé à une consommation élevée de vin rouge, ce qui avait été appelé le « French paradox » (**Sahnoun *et al.* 1992**). De nombreuses plantes médicinales sont traditionnellement utilisées dans le traitement du diabète et les polyphénols contenus dans certaines de ces plantes seraient à l'origine de leurs effets thérapeutiques (**Han *et al.*, 2017**).

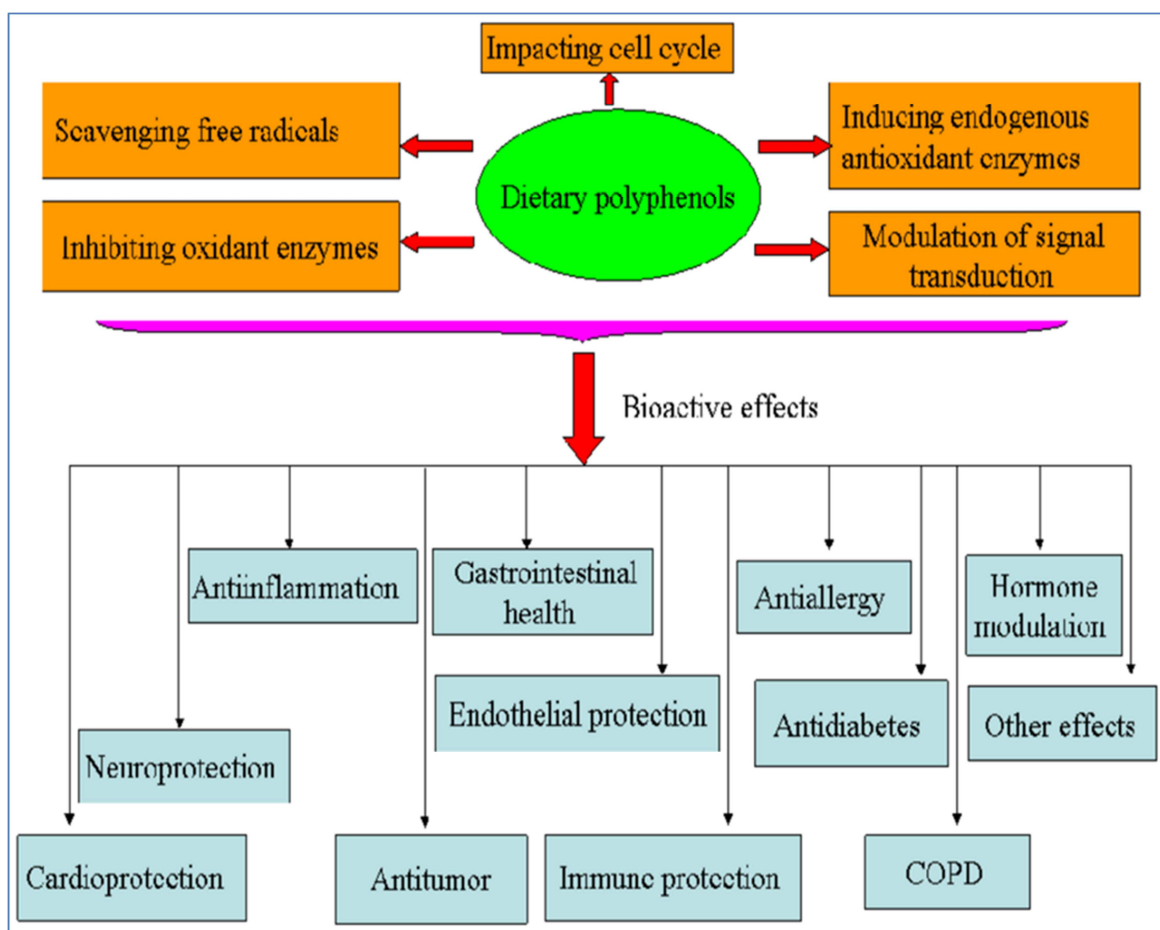


Figure 15: Effets biologiques possibles des polyphénols (**Han *et al.*,2017**)

A /Activité antioxydante

Les polyphénole ont une forte activité antioxydante qui se déroule selon trois principaux mécanismes (**Halliwell, 2006**) :a) Le piégeage direct des ROS ;b) L'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant ;c) la chélation des traces métalliques responsables de la production des ROS; d) La protection des systèmes de défense antioxydants. Ce caractère antioxydant est leur propriété fondamentale. A ce titre, ils agissent à plusieurs niveaux. L'inhibition de la production des ROS par les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes, peut procéder directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe des ROS (**Han et al., 2017**). Cette double action est bien illustré par le cas de la xanthine oxydase, cet enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde (O_2^{\bullet}).

Ils sont également connus pour inhiber d'autres enzymes impliquées dans la génération de ROS telles que les cyclooxygénases, les lipooxygénases, ou les monooxygénases microsomiales. Le radical superoxyde réagit avec le peroxyde d'hydrogène en présence de fer pour donner par dismutation des radicaux hydroxyles encore plus toxiques (OH^{\bullet}). C'est cette réaction, appelée réaction de Fenton, catalysée par le fer, qui est inhibée par certains flavonoïdes tels que la quercétine. La capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres, la communauté scientifique a pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants (**Ahmadinejad et al., 2017; Han et al.,2017**):

1- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.

2- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.

3- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille du flavonoïde.

C/ Activité Anti-inflammation

Les propriétés antioxydantes des polyphénols ont longtemps été considérées comme étant le principal phénomène expliquant leurs effets protecteurs. Cependant, de nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation (**Garcia-Lafuente *et al.*, 2017**). L'une de ces molécules poly phénoliques la plus étudiée est le curcuma qui agit sur les différents voies de signalisation impliquées principalement dans la modulation de l'inflammation et d'autres voies (**Nagaraju *et al.*, 2012**) selon la **Figure 16**. Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation dans le plasma (**Salas- Salvado *et al.* 2008**), que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines (IL-8, IL-13 et IFN- α) circulantes (**Liu *et al.* 2016**).

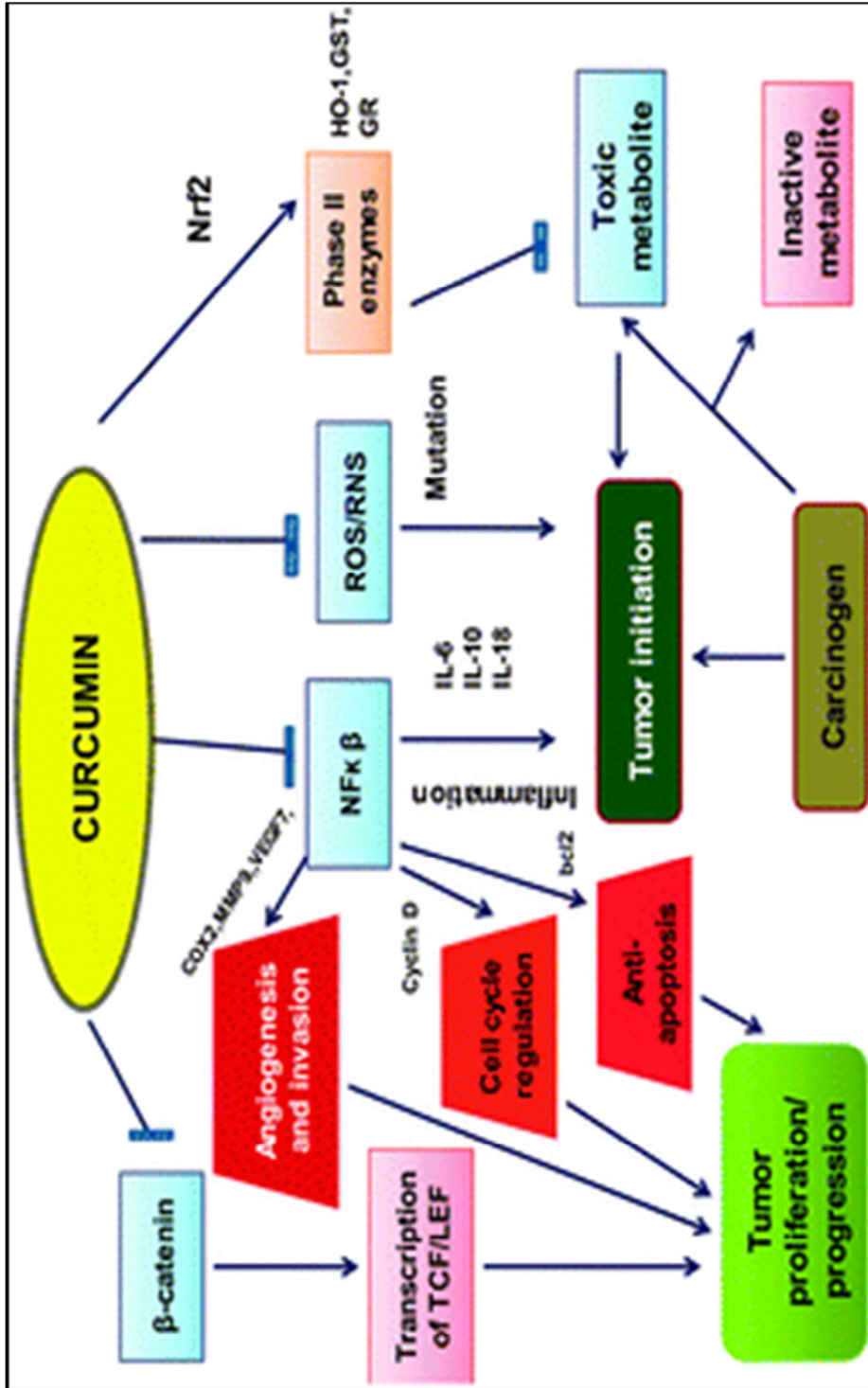


Figure 16: Mécanismes moléculaires de curcuma dans la cellule (Nagaraju et al., 2012)

MATERIEL ET METHODES

1. Données sur la plante *Lifago dielsii*

1.1. Récolte et extraction de la plante *Lifago dielsii*

La plante étudiée a été choisie essentiellement sur la base de son intérêt ou elle et utiliser traditionnellement pour traiter le diabète et aussi du fait que il n'y a aucune étude d'évaluation pharmacologique de *Lifago dielsii*. Jusqu'à maintenant. Le **Tableau1** montre la classification scientifique de cette plante. Le matériel végétal utilise est constitué des feuilles et tiges de *Lifago dielsii*. Elle est récoltée durant le stade de la floraison en avril 2011 dans le sud de l'Algérie. L'authentification de cette plante a été faite par Monsieur Abed Alhakem (Direction de Forêts, Bechar, Algérie) selon les travaux d'**Ozenda (1958)**. L'extraction de la plante d'étude est réalisée par dans l'unité de recherche (VARENBIOMOL), université Frères Mentouri, Constantine.

Le matériel végétal fraîchement collecté a été séché sur du papier à l'ombre, à température ambiante et dans un endroit sec à l'abri de l'humidité pendant quelques jours jusqu'au moment de préparation des extraits). La partie aérienne de la plante *Lifago dielsii*. a été utilisé dans la préparation des extraits. Les parties aériennes de *L. dielsii* (2000 g) ont été macérées avec MeOH / H₂O (80:20 v / v) pendant 48 h trois fois. L'extrait brut a été concentré à température ambiante. Et dilué avec 900 ml de H₂O. La solution aqueuse restante a été successivement extraite avec CHCl₃, EtOAc et n –BuOH. Ce dernier extrait a été choisi pour réaliser la présente recherche.

Règne:	Plantae
Ordre:	Asterales
Famille:	Asteraceae
Sous famille:	Asteroideae
Tribe:	Inuleae
Genre:	<i>Lifago</i> Schweinf.&Muschl.
Espèce	<i>Lifago dielsii</i> Schweinf.&Muschl.

Tableau 1: La classification scientifique de [Lifago dielsii](#)

2. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo*

2.1. Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante

2.1.1. Test du pouvoir réducteur

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu (1986). Les différentes concentrations de l'extrait et le standard dans l'eau distillée (2,5ml) sont mélangés avec le tampon phosphate (50mM, pH7) et le ferricyanide de potassium (1%). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20min. Un volume de 2,5ml acide trichloroacétique(10%) est ajouté au mélange, on centrifuge pendant 30min (3000 rpm). Le surnageant est mélangé avec l'eau distillée et 0,5ml de FeCl₃ (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700nm. L'augmentation de l'absorbance indique l'augmentation du pouvoir réducteur. La quercétine est utilisée comme standard de comparaison.

2.1.2. Test du piégeage du radical hydroxyle

La capacité à piéger le radical hydroxyle par les extraits des plantes est basée sur la réaction de Fenton en mesurant la génération du radical °OH et son effet sur l'oxydation et la dégradation des molécules biologiques tels que le désoxyribose de l'ADN. Le mélange réactionnel pour ce teste est constitué des réactifs suivants : 0.4 ml de la solution tampon phosphate (10mM, pH = 7,4), 1 ml de l'extrait à différentes concentrations, 0,1 ml de l'EDTA (1,04 mM), 0,1 ml de FeCl₃ (1 mM) et 0,1 ml de 2-désoxyribose (2,5 mM). La réaction est commencée par l'addition de 0,1 ml de l'acide ascorbique (2mM) et 0,1 ml de H₂O₂ (10 mM). Après l'incubation à 37°C pendant 1 heure, 1 ml de l'acide thiobarbutirique (TBA) (10 g/l) est ajouté dans le milieu réactionnel suivi par 1 ml de TCA (5%). Les mélanges sont placés au bain marie à 100°C pendant 15 min et puis sont refroidit avec de l'eau. L'absorbance des solutions est mesurée à 532 nm avec le spectrophotomètre contre le blanc. La quercétine est utilisée comme standard de comparaison (**Halliwell *et al.*, 1987**).

La capacité du piégeage du radical hydroxyle est évaluée avec le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de 2-désoxyribose par les radicaux hydroxyles. Le pourcentage du piégeage est calculé en basant sur la formule. Le pourcentage d'inhibition est déterminé par la **formule 1**:

$$\% \text{ d'inhibition} = [1 - (\text{Absorbance du test} / \text{Absorbance du contrôle})] \times 100$$

2.1.3. Test de la capacité antioxydant totale

Elle est évaluée par la méthode de Phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO^{2+} en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide (Prieto *et al.*, 1999). Pour ce faire, 0,3ml de chaque extrait à différentes concentrations est mélangés à 3ml d'un réactif composé de H_2SO_4 (0,6 M), de Na_2PO_4 (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube est ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 0,3ml de méthanol mélangé avec 3 ml du réactif mentionné ci-dessus. Les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. La quercétine a été utilisée comme référence standard.

2.1.4. Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique

L'activité antioxydante de l'extrait de la plante est mesurée par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique en utilisant la méthode au thiocyanate ferrique, selon la méthode décrite par Takao *et al.*(1994). Le mélange réactionnel contenant respectivement 0,4 ml d'extraits, 0,4 ml d'acide linoléique (2,5%) et 0,8 ml de tampon phosphate (pH 7,4) est incubé dans un bain-marie pendant 1 heure à 40° C. Un volume (0,1 ml) de cette solution est alors ajouté au mélange constitué de 5 ml d'éthanol 70 % et 0,1 ml de thiocyanate d'ammonium (30 %). Après 3 minutes, 0,1 ml de FeCl_2 préparé dans 3,5 % de HCl (20 mM) est ajouté au milieu réactionnel. L'absorbance de la coloration rouge de la solution est lue à 500 nm au spectrophotomètre toutes les 24 heures jusqu'à ce que l'absorbance du contrôle

négatif (eau distillée) atteint son maximum. La quercétine a été utilisée comme référence standard. Le pourcentage d'inhibition est déterminé par la formule 1 précédente.

2.1.5. Effet chélateur du fer

La capacité chélatrice de l'extrait de BELD est déterminée selon la méthode de **Dinis. (1994)**. La méthode est basée sur l'inhibition de la formation du complexe [Ferrozine- Fe^{2+}] après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} . Pour cela, 1000 μ l des solutions d'extraits ou du chélateur standard (EDTA) à différentes concentrations sont additionnées à 50 μ l de chlorure de fer (2 mM) et 750 μ l de méthanol. Après 5 min d'incubation, deux cent microlitres de ferrozine (5 mM) sont ajoutés, et le mélange est agité et laissé réagir pendant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance du complexe [Ferrozine- Fe^{2+}] est mesurée à 562 nm. . Le pourcentage d'inhibition est déterminé par la formule 1 précédente.

2.1.6. Effet anti –oxyde nitrite *in vitro*

L'effet radical oxyde nitrique (NO) a été évalué selon la méthode de **Sreejayan and Rao.(1997)** basée sur la réaction. Le mélange réactionnel contenant 3 ml de nitroprusside de sodium (0.2 M), 1 ml d'une solution saline du tampon phosphate (pH 7.4) et 1 ml de BELD à concentrations variantes (50 à 1300 μ g/ml) est incubés à 25 °C pendant 2 heures. Après l'incubation, 0.5 ml de réactif de Griess (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl éthylène diaminedihydrochloride dans 2 % H_3PO_4) a été ajouté à 0.5 ml de mélange réactionnel puis incubés à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. L'absorbance du chromophore formé est mesurée à 546nm. Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule 1 précédente.

2.2. Evaluation *in vivo* de l'activité antioxydante et hepatoprotectrice

2.2.1. Animaux et protocole d'expérimentation

L'analyse de l'effet hépatoprotecteur de la *Lifago dielsii* vis-à-vis la toxicité des antituberculeux a été réalisée sur des rats *Wistar Albinos* adultes (180–250 g). Les animaux sont issus par élevage au niveau de l'animalerie de l'Université Mentouri de Constantine 1. Les rats sont maintenus dans les conditions standards et ont libre accès à l'eau et à la nourriture. Les rats sont répartis en 4 lots expérimentaux à raison de 6 rats par lot comme suit :

1. **Premier groupe** (contrôle normale) : ces rats sont traités quotidiennement par gavage gastrique de 0,5ml/Kg de NaCl (0,9%) pendant 15 jours.
2. **Deuxième groupe** (INH/ RIF): ces rats sont traités quotidiennement par un traitement combinée constituer de l'isoniazide (INH à 75mg/kg ; *ip*) et de la rifampicine (RIF à 150mg /kg; *ip*) pendant 14 jours.
3. **Troisième groupe** (Quercétine+ INH/ RIF): ces rats sont traités quotidiennement par voie orale de la quercétine (50 mg/kg) et du traitement combiné (INH à 75mg/kg et de la RIF à 150mg /kg) pendant 14 jours.
4. **Quatrième groupe** (BELD +INH /RIF): ces rats sont traités quotidiennement par voie orale de l'extrait butanolique de *Lifago dielsii* (BELD: 200 mg/kg) et du traitement combiné (INH à 75mg/kg et de la RIF à 150mg /kg) pendant 14 jours.
 - L'INH, RIF, quercetin et BELD sont préparés dans NaCl 0,9%.

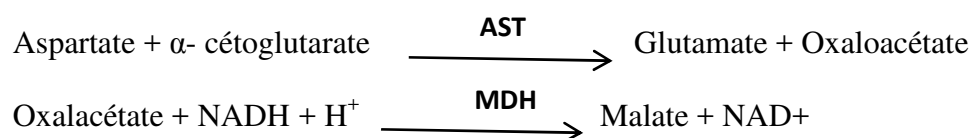
A la fin du traitement et après un jeûne de 12 heures, un prélèvement sanguin est réalisé au niveau du sinus caverneux de l'animal à l'aide de microcapillaires stériles. Le sang est récolté sur des tubes secs et EDTA respectivement pour les analyses biochimiques de la fonction hépatique. Ensuite, le foie est prélevé et lavé. Une partie de cet organe est conservé dans le formol 10% en vue d'analyse histologique. Le reste du foie est utilisé pour dosage de paramètres du stress oxydo- nitrosatif et d'apoptose. Pour cela, les foies prélevés ont été homogénéisés (10%) dans du Tris-HCl 20mM (contenant EDTA 1mM, pH 7,4). L'homogénat a été centrifugé à 800 x g pendant 5 minutes, à 4°C. Le surnageant obtenu a été centrifugé à 9600 x g pendant 45 minutes, à 4°C. Le surnageant résultant a été utilisé pour déterminer les paramètres du stress oxydo-nitrosatif.

2.2.2. Evaluation de la fonction hépatique

Les dosages des paramètres biochimiques ont été réalisés par automate et selon les protocoles appropriés des Kits du commerce.

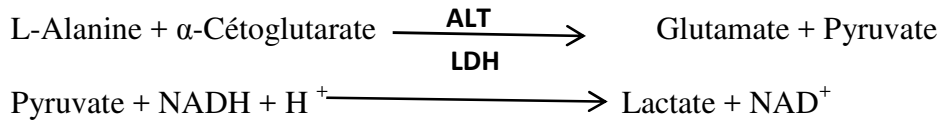
2.2.2.1. Aspartate aminotransferase (AST)

L'AST catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'aspartate à l'acide α -cétooglutarique en formant l'acide glutamique et l'acide oxaloacétique. L'acide oxaloacétique produit est réduit en Malate par Malate déshydrogénase (MDH) et NADH :



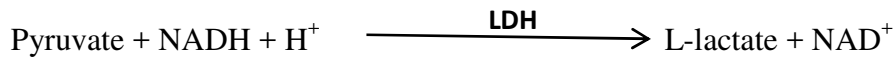
2.2.2.2. Alanine aminotransferase (ALT)

L'ALT catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'alanine à l'acide α -cétoglutarique en formant l'acide glutamique et l'acide pyruvique. L'acide pyruvique produit est réduit en acide lactique par Lactate déshydrogénase (LDH) et NADH:



2.2.2.3. Lactate déshydrogénase (LDH)

Le lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réduction de la pyruvate par le NADH, selon la réaction suivante :



La vitesse de diminution de la teneur en NADH dans le milieu déterminé par photométrie est proportionnelle à la concentration catalytique de LDH dans l'échantillon testé.

2.2.2.4. Phosphatase alcaline (ALP)

La phosphatase alcaline (ALP) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophenyl phosphate a pH 10,4 pour donner le p-nitrophenol et le phosphate. La formation de p-nitrophenol est mesurée par spectrophotométrie, ou elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans l'échantillon.

2.2.2.5. Bilirubine totale

Le dosage de la bilirubine totale est basé sur la réaction entre l'acide sulfanilique et le nitrite de sodium qui donne de l'acide sulfanilique diazoté. En présence de diméthyl sulfoxyde (DMSO), la bilirubine totale se couple avec l'acide sulfanilique diazoté pour donner l'azobilirubine. L'absorbance des échantillons est lu à 555 nm.

2.2.3. Evaluation du profil lipidique

2.2.3.1. Dosage du cholestérol

Il s'agit d'une méthode enzymatique. Les esters du cholestérol sont hydrolysés par le cholestérol ester hydrolase en cholestérol libre et acide gras. Le cholestérol libre produit et celui préexistant est oxydé par un cholestérol oxydase en A4 Cholestérol et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxydase, oxyde le chromogène en un composé colore en rouge. La lecture des densités optiques se fait à 520 nm contre le blanc réactif.

2.2.3.2. Dosage des teneurs en HDL

Le cholestérol-HDL est une lipoprotéine qui est considérée comme étant du bon cholestérol, il est véhiculé vers le foie pour être métaboliser et excréter sous forme de sels biliaires, il n'est pas athérogène par opposition au reste du cholestérol lié à la fraction VLDL-LDL. Après une précipitation par l'acide phosphotungstique en présence d'ions magnésium, les chylomicrons et les lipoprotéines de faible densité (LDL) et de très faible densité (VLDL) contenus dans le sérum, on procède au dosage enzymatique des lipoprotéine de haute densité (HDL) contenue dans le surnageant obtenue après centrifugation.

2.2.3.3. Dosage de teneurs en LDL

Fraction du cholestérol contenue dans les lipoprotéines de type LDL. Celui-ci correspond à l'essentiel du cholestérol transporté dans le sang. La formule de Friedewald permet de calculer la valeur du cholestérol-LDL à partir du cholestérol total, du cholestérol - HDL et des triglycérides. La méthode de calcul des LDL -cholestérol de Friedewald.

$$\text{LDL-Cholestérol (en g/L)} = (\text{Chol. total}) - (\text{Chol. des HDL}) - (\text{Triglycérides}) / 5$$

2.2.3.4. Dosage des triglycérides sériques

Le dosage des triglycérides se fait par voie enzymatique. Par l'action de lipases spécialisées, lipoproteines lipase, les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et en acide gras libre. Le glycérol est ensuite transformé en glycerol-3-phosphate (G3P) et adenosine diphosphate par glycerol kinase et ATP. Le G3P est ensuite converti par glycérol phosphate deshydrogenase en Dihydroxy-acetone et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier réagit avec 4-aminophenazone (4-AP) et p-chlorophenol en présence de peroxydase donne un composé coloré en rouge. La concentration en quinone colorée (rose) mesurée à 505 nm est directement proportionnelle à la quantité de triglycérides contenue dans l'échantillon

2.2.3.5. Dosage des triglycérides hépatiques

Les lipides totaux hépatiques sont extraits et dosés suivant la technique de **Folch et al. (1957)**. Celui-ci propose une extraction des lipides du foie (0,5 g) par un mélange de solvants polaire/apolaire (chloroforme/méthanol). Le chloroforme permet une dissolution totale des lipides et le méthanol la précipitation des protéines libérées. Après les filtrats utilisés pour la quantification des lipides totaux la mesure de la teneur en triglycérides hépatiques a été faite avec le Kit de réactif des glycérides. Les résultats sont exprimés en mg des triglycérides par g de tissu hépatique.

2.2.4. Evaluation *in vivo* de stress oxydatif

2.2.4.1. Mesure de taux de la malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynoninal (4-HNE) et le dosage des hydroperoxydes lipidiques (LHP)

✓ Les mesures de la MDA hépatique et des teneurs en 4-HNE ont été déterminées selon la méthode de **Gerard-Monnier *et al.* (1998)**. Brièvement, 0,65 ml de 1-méthyl-2-phényl-indole, 3 mM dans de l'acéto-nitrile dilué avec du méthanol contenant 32 μM de FeCl_3 (3: 1) a été ajouté à 0,2 ml d'homogénat. Après avoir ajouté 0,15 ml de HCl à 37% (v / v) (pour le MDA seul) ou 99% (v / v) l'acide méthane sulfonique (pour MDA + 4-HNE), les échantillons ont été incubés à 45°C (60 min pour MDA et 40 min pour (MDA + 4-HNE)). Après refroidissement, les échantillons ont ensuite été centrifugés à 4000 x g pendant 10 min, l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 586 nm. Deux courbes standard composées de 1,1,3,3-tétraméthoxypropane et de 4-HNE ont également été dosé. La quantité de 4-HNE a été obtenue par la soustraction des valeurs MDA de les valeurs totales (MDA + 4-HNE) et a été exprimée en nM / mg de protéine.

✓ Pour le dosage des hydroperoxydes lipidiques (LHP), d'abord l'extraction des hydro peroxydes lipidiques dans le chloroforme a été réalisée, l'extrait directement utilisée pour l'estimation du LHP en utilisant une méthode d'extraction quantitative la méthode de kit pour le dosage de LHP. L'absorbance a été lue à 500 nm (**Jack *et al.*, 2011**).

2.2.4.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

L'activité enzymatique de la CAT est déterminée par la méthode de **Clairborne et (1985)**. Le principe est basé sur la disparition de l' H_2O_2 en présence de la source enzymatique à 25 C° et la formation de l'eau et oxygène. Pour l'évaluation de l'activité enzymatique de CAT, un mélange est constitué de 1 ml de tampon phosphate (0,1M, pH 7.5), 0,750 ml de H_2O_2 fraîchement préparé (91mM) et 20 μ l d'échantillon. L'absorbance est lue à 240 nm chaque minute pendant 3 minutes et l'activité enzymatique est calculée en terme d'unité par minute et par gramme de protéine (U / min/g protéine).

2.2.4.3. Mesure de l'activité de la peroxydase (POD)

L'activité de la POD a été mesurée à 25°C selon **Chance et al.(1955)** en utilisant un mélange réactionnel composé de 0.1 ml guaiacol (20 mM), 0.3 ml of H_2O_2 (40 mM), 0.1 ml d'échantillon et compléter à 2,8 par tampon de phosphate (50 mM, pH 5.0) .Les changements dans l'absorbance de la solution de réaction à 470 nm ont été déterminés pendant une minute. L'activité de la POD a été définie comme un changement d'absorbance de 0,01 unités par min. Les activités enzymatiques ont été exprimées U/mg protéine.

2.2.4.4. Mesure de l'activité de super oxyde dismutase (SOD)

L'activité de la SOD a été mesurée comme décrit précédemment par **Winterbourn et al., 1975)**. Cette méthode est basée sur la capacité de la SOD à inhiber l'auto-oxydation du pyrogallol. Brièvement, 0,1 ml d'homogénat de foie a été mélangé avec 1,5 ml de Tris-HCl 20 mM (contenant de l'EDTA 1 mM, pH 8,2), puis 0,1 ml de pyrogallol 15 mM a été ajouté. Ensuite, la variation d'absorbance par minute a été déterminée en surveillant l'augmentation de l'absorbance à 420 nm pendant 3 min pour les échantillons. L'activité enzymatique de la

SOD est exprimée en U / mg de protéine, une unité étant définie comme la quantité d'enzyme qui inhibait le taux de pyrogallol.

2.2.4.5. Mesure l'activité de la glutathion S- transférase (GST)

La mesure de l'activité des GST consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du chlorodinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et du glutathion. La méthode utilisée dans cette étude pour mesurer l'activité de la GST est de **Habig *et al.*(1984)**. Le milieu réactionnel contient 25µl d'échantillon, 300µl de la GSH (30mM), 100µl de CDNB (30mM) et 2,8ml de PBS (pH7,4) . Après un 5min d'incubation à 37°C, L'absorbance est lue à 412 nm contre un blanc. Les concentrations sont exprimées en U/mg protéine.

2.2.4.6. Mesure l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de GPx a été mesurée par la méthode décrite par **Rotruck *et al.*, 1973**. Brièvement, le mélange réactionnel contenait 0,5 ml de tampon phosphate (0,4 M, pH 7,0), 0,1 ml de sodium azide (10 mM) , 0,3 ml de tissu homogénéisé dans tampon phosphate, 0,2 ml de glutathion et 0,1 ml de H₂O₂ (0,2 mM). Le contenu a été incubé pendant 10 minutes à 37 ° C, 0,4 ml de TCA à 10% a été ajouté pour arrêter la réaction et centrifugé à 3200 x g pendant 20 min. Le surnageant a été testé pour le contenu de glutathion en utilisant le réactif Ellman (19,8 mg d'acide 5, 50-dithiobisnitrobenzoïque (DTNB) dans 100 ml de citrate de sodium à 0,1%). L'activité a été exprimée en U / mg de protéine.

2.2.4.7. Mesure de taux du glutathion (GSH)

Le dosage du GSH est basé sur la méthode colorimétrique d'Ellman (1959). Le principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5, 5'- Dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) absorbant à 412 nm, selon la réaction suivante. Pour ce dosage, 0,5ml d'homogénat est traité par l'acide trichloracétique TCA (2ml, 1%) puis centrifugé à 2000g /min. À un volume du surnageant obtenu, 2 ml de tampon phosphate (0,1M, pH 7,4) et de surnageant), 200 µl de DTNB (0,1M) sont additionnés. L'absorbance est lue à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 5 %. Les concentrations sont calculées à partir d'une gamme étalon de la GSH et ils sont exprimés en µM/mg protéine.

2.2.4.7. Dosage de niveau de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le H₂O₂ a été dosé par oxydation du phénol dépendante de l'oxydation de phénol par une peroxydase (horse radish peroxidase-dependent) selon Piriou *et al.*(1979). L'absorbance enregistrée à 610 nm contre. La quantité de H₂O₂ produite a été exprimée en nM H₂O₂ / min / mg de protéine sur la base de la courbe standard H₂O₂.

2.2.5. Evaluation du stress nitrosatif hépatique

2.2.5.1. Dosage du taux d'oxyde nitrique

Les produits de nitrate / nitrite (NO_x) totaux ont été estimés étant un indice de synthèse d'oxyde nitrique (NO[•]) selon la méthode de **Miranda *et al.* (2001)**. Pour ce faire, un volume d'homogénat de foie (0,5 ml) et 0,25 ml de NaOH 0,3N sont incubés pendant 5 minutes à une température ambiante. Après un volume de 0,25 ml de ZnSO₄ à 5% (p / v) a été ajouté et suivi par une centrifugation à 3000g pendant 20 min à 4 ° C. Un volume de 0,4 ml du surnageant obtenu a été ajouté à 0,3 ml de VCl₃ (8 mg / ml) et 0,3 ml de réactif de Griess. Après une incubation de 45 min à 37 ° C, Les absorbances des échantillons ont été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm. La concentration de NO_x hépatique été déterminée à partir d'une courbe standard de NaNO₃.

2.2.5.2. Dosage du taux de protéines carbonylées

Le taux de protéines carbonylées a été estimé selon la méthode décrite par **Shacter (2000)**. Après avoir dilué l'homogénat à 1 mg / ml. Un volume de 250 µl de dernière et 2,4-dinitrophénylhydrazine (10 mM, dissous dans HCl 2,5 M) ont été mixé et maintenu dans l'obscurité pendant 20 minutes. Ensuite, 125 µl d'acide trichloroacétique à 50% (TCA) ont été ajoutés, mélangés soigneusement et incubés à -20°C pendant 15 minutes. Après, une centrifugation à 9000g à 4 ° C pendant 10 minutes, le surnageant a été jeté et le culot a été lavé deux fois dans de l'éthanol glacé constitué de acétate d'éthyle (1:1). Finalement, les culots ont été repris dans 1 ml de chlorhydrate de guanidine (6M) et l'absorbance des échantillons a été lue à 370 nm

2.2.5.3. Dosage du taux de nitrosothiols

Ce dosage est basé sur la méthode décrite par **Cook *et al.*(1996)** qui utilise un mélange de chlorhydrate de sulfanilamide / N-1-naphtyléthylènediamine comme un réactif. Les échantillons ont été mis en suspension 1: 4 dans du PBS (pH 7,4) contenant 10 mM de N - éthylmaléimide et 4mM de ferricyanure de potassium, acidifié avec de l'acide sulfosalicylique à 25% puis centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant ont été ajouté à 40 µl de sulfamate d'ammonium à 1%, 200 µl de HCl 0,4N contenant 0,3% de HgCl₂ et 4,6% de sulfanilamide, et 300 µl de HCl 0,4 N contenant 0,2% de réactif. Après 30 minutes d'incubation à 25 ° C, les échantillons ont été analysés par spectrophotométrie à 544 nm. Des étalons ont été préparés en faisant réagir du glutathion réduit et du nitrite réduits dans l'eau.

2.2.6. Mesure de l'activité de la caspase-3

Le dosage l'activité enzymatique de la caspase-3 est basé sur la méthode décrite par **Rodrigues *et al.*(2003)** et selon les instructions du Kit commercial. Le clivage enzymatique du chromophore p-nitroanilide (pNA) du substrat N-acétyl-Asp-Glu-ValAsp-pNA désigne l'activité caspasique générale. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 37 ° C pendant 1 heure et la formation de pNA a été mesurée à 405 nm.

2.2.7. Dosage de protéines

Les taux de protéine des échantillons ont été dosés selon la méthode de **Lowry *et al.*(1951)**. Les protéines réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteus (un mélange de tungstate et de molybdate de sodium en solution dans l'acide phosphorique et l'acide chlorhydrique) pour donner des complexes colorés. Les densités optiques de colorations formées sont mesurées à 600 nm. Une gamme d'étalon de BSA a été réalisée pour déduire la concentration en protéine pour chaque échantillon dosé.

RESULTAS

Résultats

1. Activité antioxydante *in vitro* de l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* (BELD)

1.1. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur mesure la capacité réductrice de l'antioxydant, et il est évalué par la transformation de Fe^{+3} en Fe^{+2} en présence de l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* (BELD). **Figure 17** montres que le pouvoir réducteur du BELD augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait et l'augmentation significative de l'absorbance était de $1,35 \pm 0,04$ à $800 \mu\text{g/ml}$, la quercetine utilisée comme un standard atteignait un effet maximal ($1,44 \pm 0,03$) à $400 \mu\text{g/ml}$.

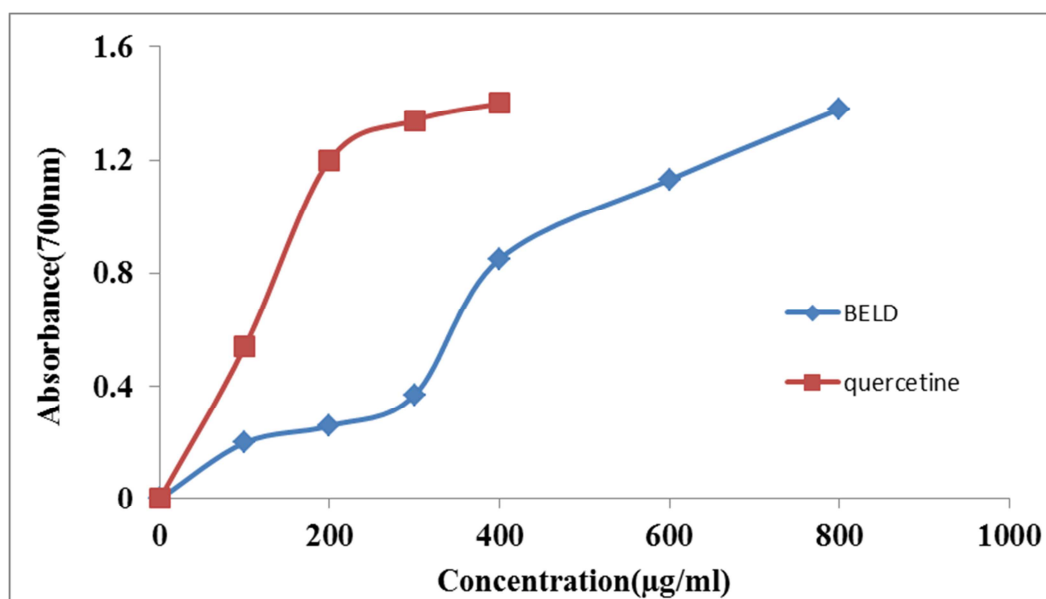


Figure 17 : Le pouvoir réducteur de l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* (BELD) et la quercetine (n=3).

1.2. Piégeage du radical hydroxyle

L'effet d'arrachement de radical hydroxyle par l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* (BELD) s'est révélé être compris entre 64,20 et 82,73% à une concentration comprise entre 300 et 600 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. L'effet de piégeage du radical hydroxyle par la quercétine a marqué une inhibition de 85,20% à 300 $\mu\text{g/ml}$ (**Figure 18**). Les valeurs d'IC₅₀ du piégeage de radical hydroxyle par l'extrait BELD et la quercétine sont $122,85 \pm 5,87$ et de $24,31 \pm 2,69$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

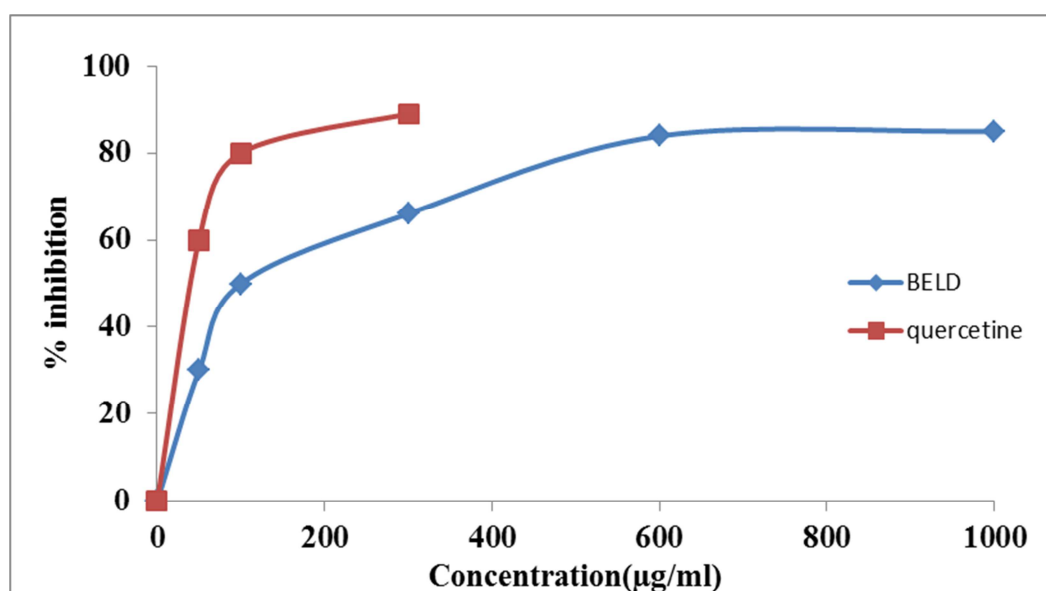


Figure 18 : Le piégeage du radical hydroxyle par l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* (BELD) et la quercétine. (n=3).

1.2. Capacité antioxydant totale

La détermination de la capacité antioxydante par la méthode au phosphomolybdène était basée sur le transfert d'électrons. Une valeur d'absorbance élevée de l'échantillon indique sa forte réduction de molybdène par l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* (BELD) et la formation d'un complexe de molybdène vert, qui a une absorption à 695 nm indiquant que le BELD a une capacité antioxydante totale. L'augmentation significative de l'absorbance pour BELD s'est avérée être de $0,75 \pm 0,06$ à $600 \mu\text{g/ml}$ par rapport à la quercétine qui a marqué une valeur de $0,97 \pm 0,01$ à $100 \mu\text{g/ml}$ (Figure 19). Les valeurs d'IC₅₀ de la capacité antioxydante totale de l'extrait BELD et la quercétine sont $226,02 \pm 6,81$ et de $38,36 \pm 1,39 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

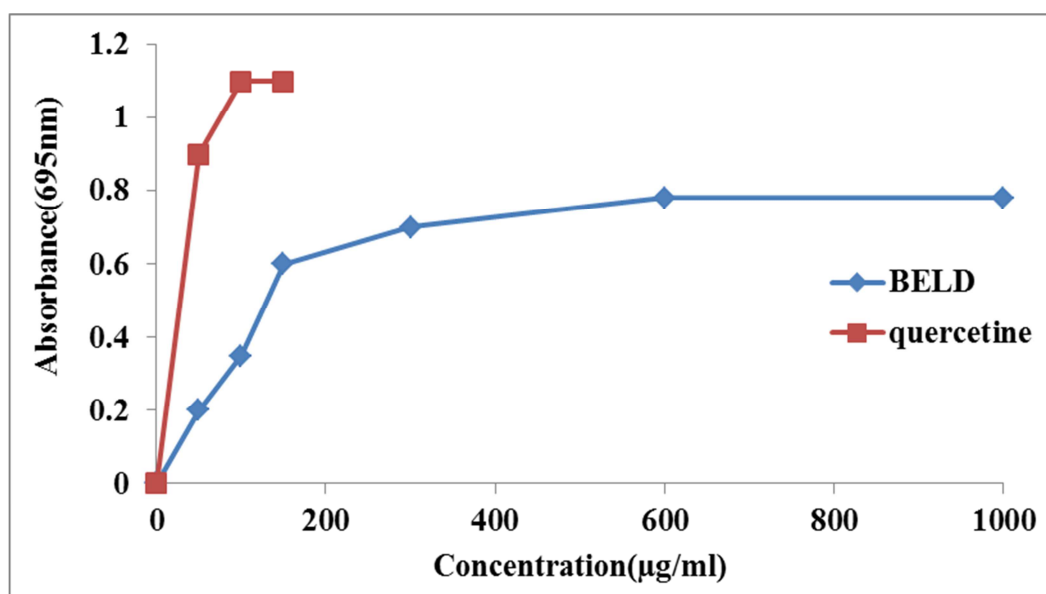


Figure 19 : La capacité antioxydante totale de l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* (BELD) et la quercétine(n=3)

1.4. Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique

L'acide linoléique, un acide gras insaturé, peut être facilement peroxydé et produit divers composés tels que des aldéhydes et des époxydes. La présente étude a surveillé la quantité de peroxyde de lipide formée toutes les 24 heures, sur une période de 4 jours, en surveillant le complexe coloré de peroxyde de lipide qui absorbe la lumière à 520 nm. Il a été constaté que le troisième jour, l'absorbance de la solution de contrôle a atteint un maximum indiquant la formation maximale des peroxydes lipidiques. Une faible valeur d'absorbance à 500 nm indique un niveau élevé d'inhibition de la peroxydation des lipides et donc une activité antioxydante élevée. La **Figure20** montre que l'absorbance de contrôle a augmenté jusqu'à $1,73 \pm 0,06$ à 72 heures, puis il a diminué. En présence de BELD à 600 $\mu\text{g/ml}$, l'absorbance a été $0,63 \pm 0,02$, tandis que celle avec la quercétine (300 $\mu\text{g/ml}$) a été à $0,34 \pm 0,02$. Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique pour BELD à toutes les concentrations (300, 600 et 1000 $\mu\text{g/ml}$) étaient de l'ordre de 40,94, 63,83 et 70,37% respectivement. Le pourcentage d'inhibition maximale de la peroxydation de l'acide linoléique pour la quercétine à 300 $\mu\text{g/ml}$ est égal à 80,15%

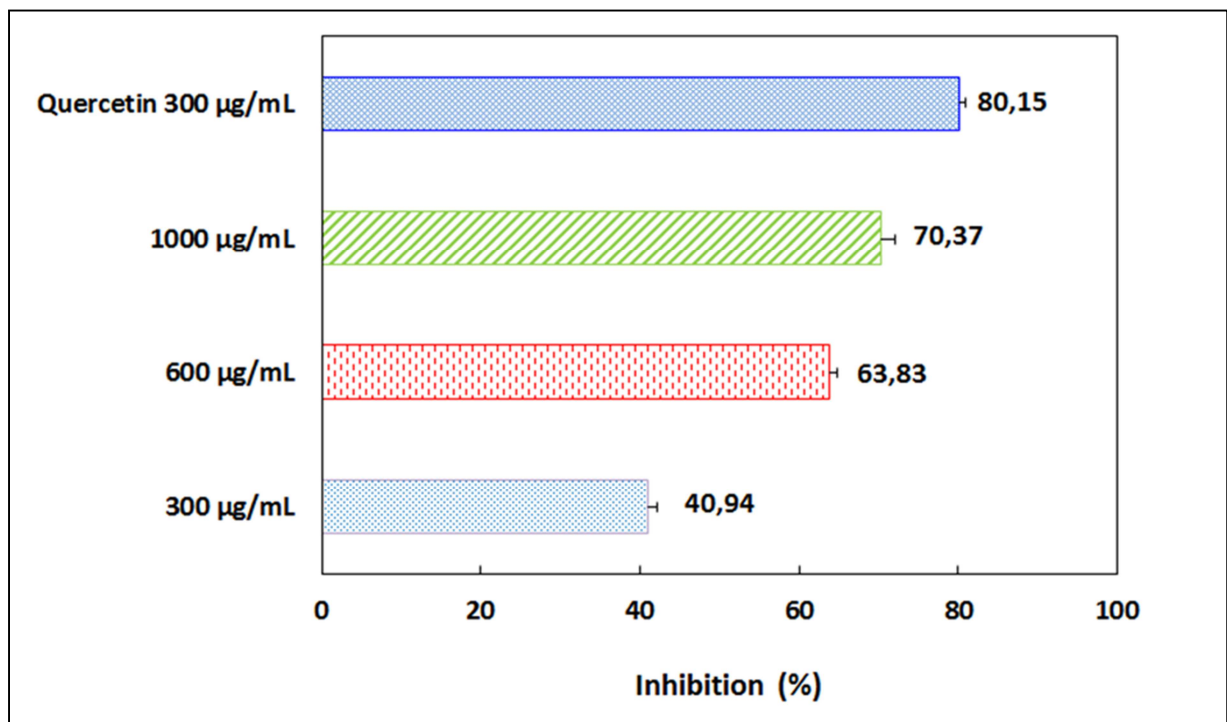
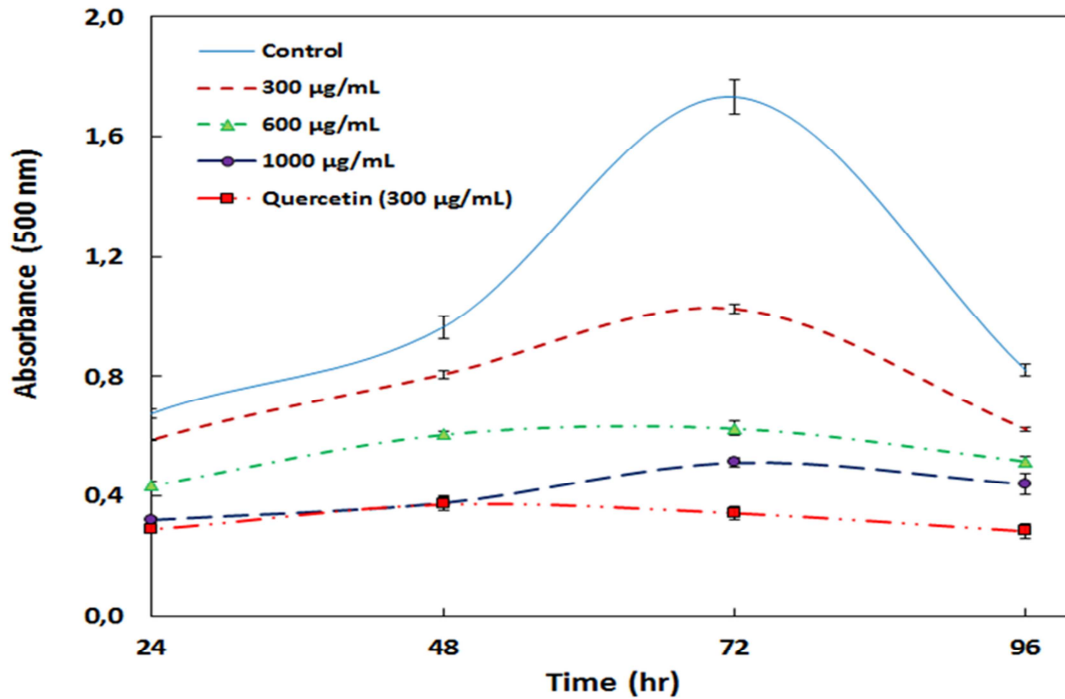


Figure 20 : L'inhibition de la peroxydation lipidique selon la méthode de thiocyanate par l'extrait butanolique de *Lifalga dielsii* (BELD/300,600 et 1000µg/ml) et la quercetine(n=3).

1.5. Effet chélateur de fer

Nos résultats montrent que la formation du complexe Fe^{2+} -ferrozine n'est pas achevée en présence de BELD. L'effet chélateur de Fe^{2+} par BELD a augmenté avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. A des concentrations comprises entre 300 et 600 $\mu\text{g/ml}$, le BELD présentait des effets chélateur de 69,43 à 74,56%. EDTA en tant qu'un chélateur standard a montré un effet de 85,80% à 300 $\mu\text{g/ml}$ (**Figure21**). Les valeurs d'IC50 de la capacité chélatrice du fer de l'extrait BEDL et le EDTA sont $144,04 \pm 17,79$ et $26,01 \pm 0,9$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

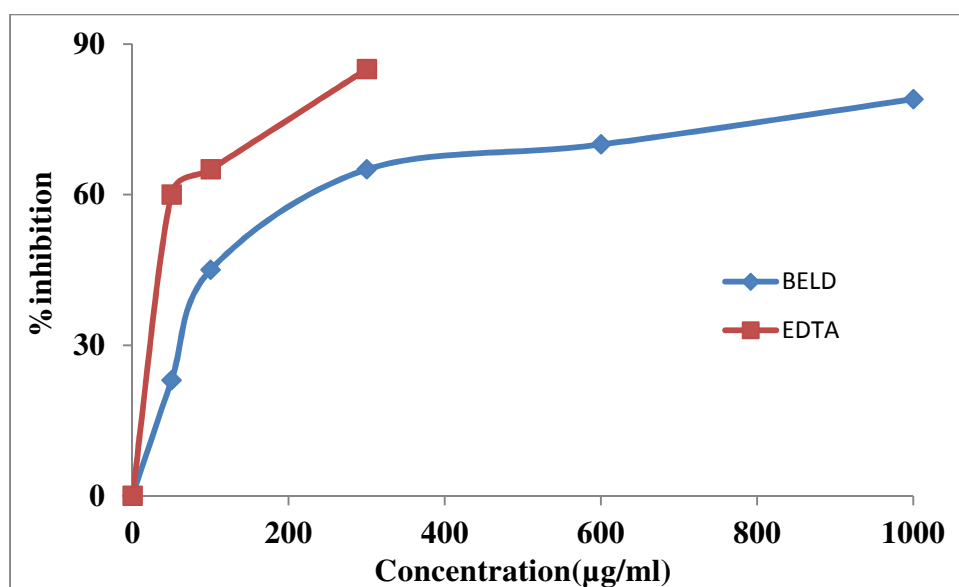


Figure 21 : Le pouvoir chélateur de fer de l'extrait butanolique de *Lifalga dielsii* (BELD) et le EDTA (n=3).

1.6. Effet scavenger de l'oxyde nitrique (NO°)

Au pH physiologique, le NO issue de la solution aqueuse SNP interagit avec l'oxygène pour produire l'ion nitrite. La capacité de piéger le radical NO est déterminée par la diminution de l'absorbance à 550 nm en présence d'une molécule antioxydante. La **Figure 22** montre que BELD inhibe la formation du nitrite d'une façon dépendante de la dose. A 600 µg/ml, BELD a enregistré une valeur d'inhibition maximale du NO° égale à 66,91 comparativement au standard quercitine qui a marqué une valeur de 82,50% à 200 µg/ml. Les valeurs IC₅₀ de BELD et du standard prouvant un effet scavenger vis-à-vis du NO° étaient 238.88±8.22 µg/ml et 37.68±7.61 µg/ml respectivement.

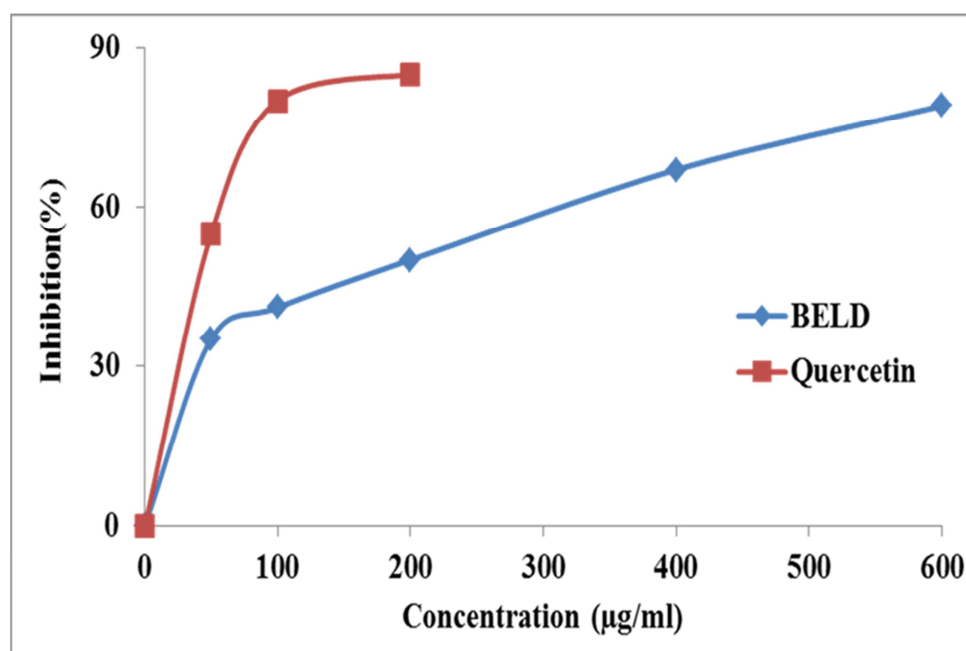


Figure 22 : Effet scavenger de BELD contre le radical NO° (n=3).

2. Effet du BELD sur la fonction hépatique

2.1. Transaminases (AST et ALT), ALP, LDH et la bilirubine totale

L'administration d'INH et de RIF pendant 14 jours a provoqué de graves lésions hépatiques caractérisées par une élévation significative ($P < 0,01$) de l'activité enzymatique des AST et ALT, ALP et LDH par rapport aux témoins. Cependant, une réduction significative ($P < 0,01$) de l'activité enzymatiques de AST et ALT, ALP et LDH (66,69%, 65,34%, 74,11% et 65,5% respectivement) a été observée chez les groupes traités par l'extrait butanolique de *Lifalga dielsii* (BELD : 200 mg / kg). Une protection significative ($P < 0,01$) a été observée pour les AST, ALT, LDH et l'ALP (85,13%, 87,83, 86,20% et 83,48% respectivement) chez le groupe traités par la quercetine à 50 mg/kg (**Figure 23A**).

De même, le traitement par INH-INF pendant 14 jours a augmenté le taux de la bilirubine total dans le sang de rats intoxiqués par rapport au groupe témoins (**Figure 23B**). Cependant, le traitement avec BELD (200 mg/kg) ou la quercetine (50mg/kg) a significativement rétabli ce paramètre (61,38% et 81,41% respectivement).

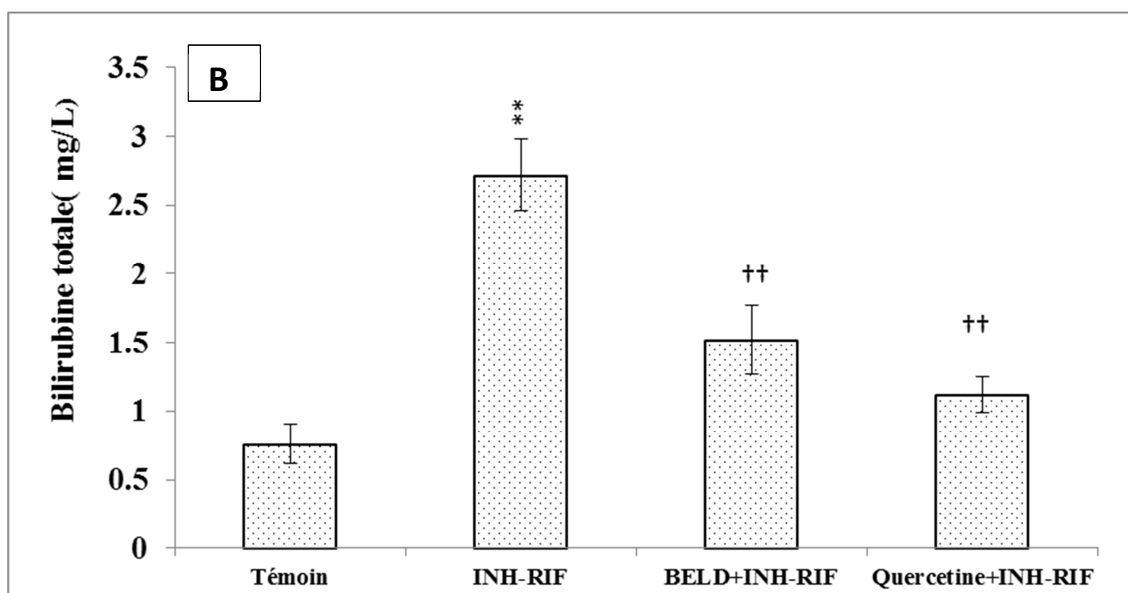
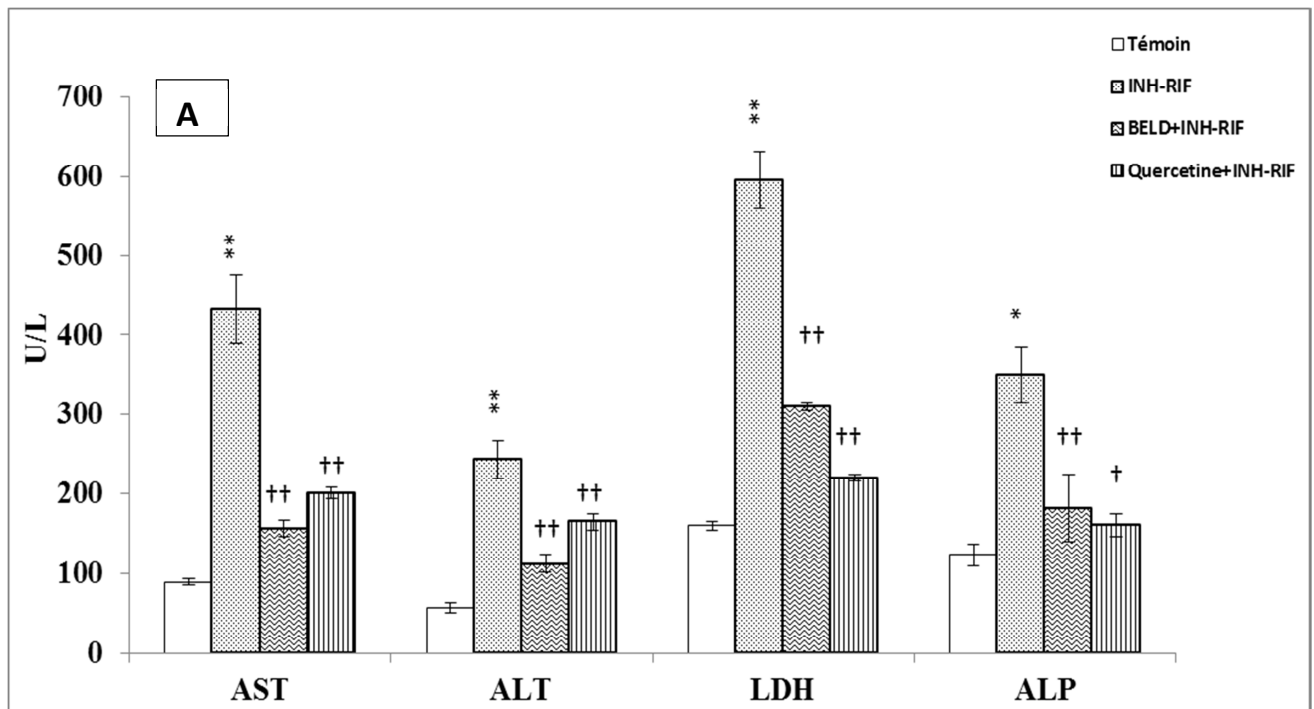


Figure 23 : L'effet de l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* (BELD) sur la fonction hépatique.

A- L'activité enzymatique de transaminase (AST et ALT), phosphatase alcaline (ALP) et le lactate déshydrogénase (LDH). **B-** Le taux de la bilirubine totale.

2.2. Profil lipidique sérique et hépatique

La **Figure 24** a montré que l'administration d'INH (75 mg /kg) et de RIF (150 mg/kg) entraînait une altération significative de paramètres en relation de profil lipidique sérique et hépatique qui était reflétée par l'augmentation ($p < 0,01$) des taux de TG hépatique et sérique et les taux sériques de LDL-C par rapport au groupe témoin. Par contre, une diminution ($p < 0,01$) marquée du taux sérique de HDL-C a été observée. Le traitement avec 200 mg /kg de l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* a significativement empêché ces altérations et maintient les niveaux de TG sérique (66%, $p < 0,01$), TG hépatique (63%, $p < 0,01$), LDL-C (60%, $p < 0,05$) et LDL-C (69%, $p < 0,05$) d'une manière comparable à celle de la quercitine.

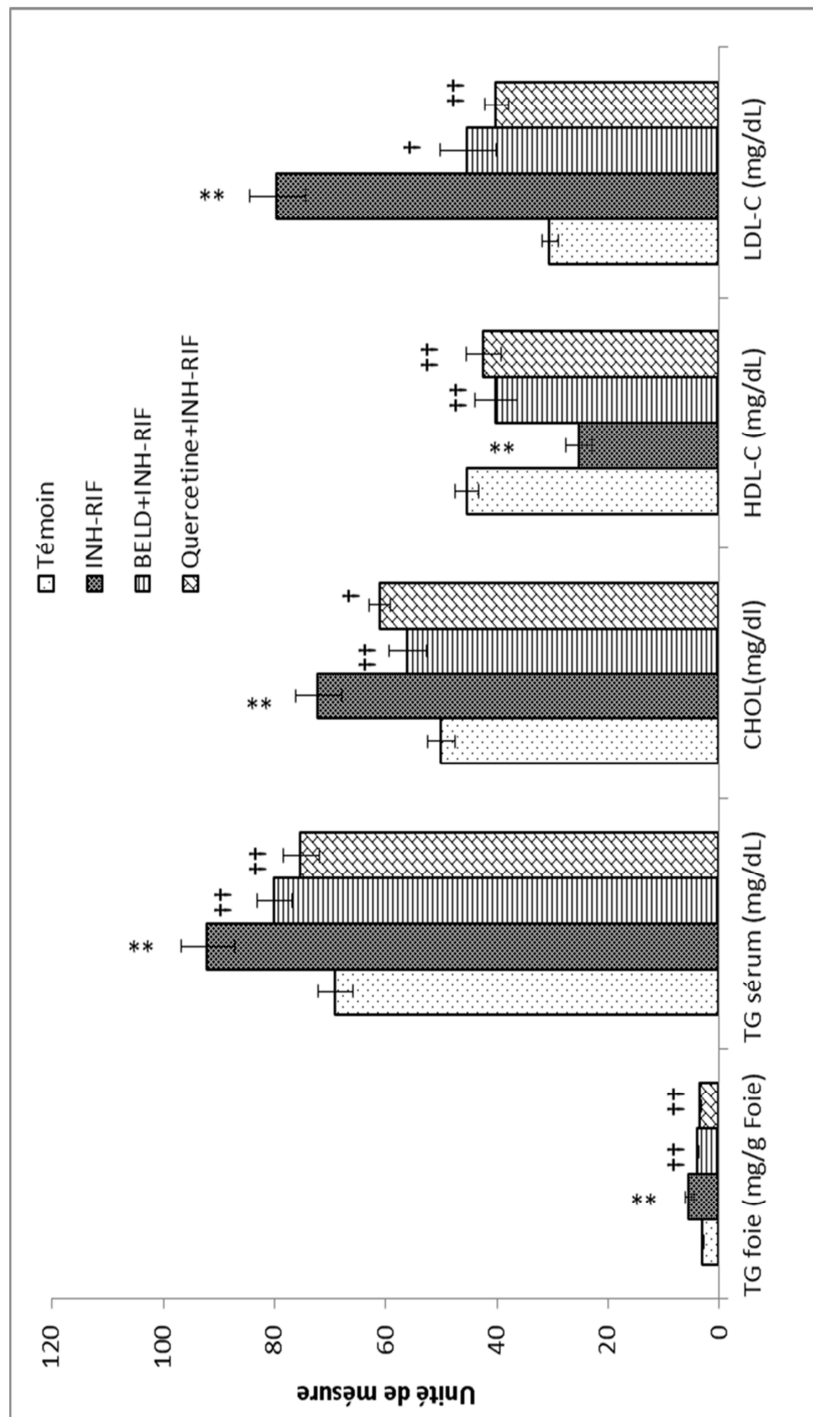


Figure 24: L'effet de l'extrait butanolique de *Lifalga dielsii* (BELD) sur les paramètres lipidiques au niveau du sérum et du foie. TG : triglycerides hépatiques, CHOL: cholestérol. ** $p \leq 0,01$ par rapport au groupe témoin, † $p \leq 0,05$ et †† $p \leq 0,01$ par rapport au groupe (RIF-INH), Valeurs exprimées en Moyenne \pm SD (n=6),

3. Effet du BELD sur le statut oxydatif hépatique

3.1. Marqueurs peroxydatifs hépatique (MDA, 4-HNE, LHP et H₂O₂)

Les marqueurs de la peroxydation lipidique en termes de MDA, de 4-HNE, de LHP et de H₂O₂ ont été significativement ($P < 0,01$) augmentés chez les rats traités par INH/ RIF par rapport au groupe témoin (**Figure 25**). Le traitement par l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii*(BELD) a nettement renversé l'augmentation de l'ensemble de marqueurs cités au-dessus, dont on a enregistré une réduction significative des taux de MDA, de 4H-NE, de LHP (76%, 63%, 60%, $P < 0,01$) et de taux de H₂O₂ (80,41%, $P < 0,05$), indiquant un l'effet hepatoprotecteur suite au traitement par BELD (**Figure 25**). Ces résultats étaient comparables à l'effet préventif de la quercétine, qui a réduit significativement ($P < 0,01$) le taux du MDA, du 4-HNE, LHP et de H₂O₂ (86%, 88%, 85% et 91,7% respectivement).

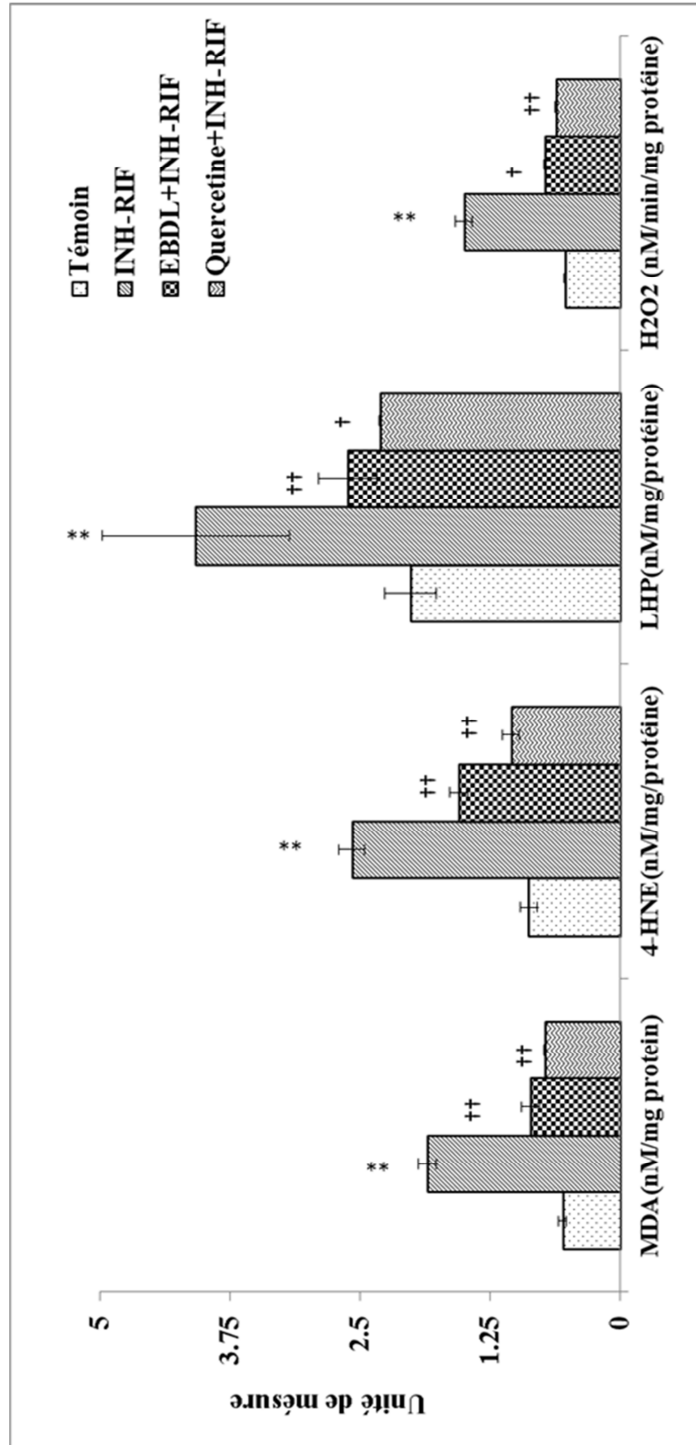


Figure 25 : L'effet de l'extrait butanolique de *Lifalgo difflora* (BELD) sur les paramètres lipidiques au niveau du sérum et du foie. MDA : malondialdéhyde, 4HNE : 4-hydroxyaldehyde, LHP : Hydroperoxyde lipidique, H₂O₂:peroxyde d'hydrogène**p≤0,01 par rapport au groupe témoin, †p≤0,05 et ††p≤0,01 par rapport au groupe (RIF-INH), Valeurs exprimées en Moyenne±SD (n=6),

3.2. Effet du BELD sur les antioxydants hépatique (CAT, POD, SOD, GST, GPx et GSH)

Contrairement à l'effet de INH et RIF sur l'augmentation des paramètres peroxydatifs précédemment mentionné (MDA, de 4-HNE, de LHP et de H₂O₂), l'administration de INH/ RIF à induit une baisse significative ($P < 0,01$) de l'activité des enzymes anti oxydantes ; CAT, POD, SOD, GST et GPx et aussi le taux de la GSH hépatique, chez les rats traités par INH/ RIF par rapport aux rats témoins (**Figure 26**).

Cependant le traitement avec 200 mg / kg de par l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* (BELD) a augmenté significativement ($p < 0,01$) l'activité des d'antioxydants enzymatiques du foie à savoir CAT(73,26%), POD(63 %), SOD(71,45%), GST(45,12%) et GPx (59,23%), et le taux de la GSH (70,63%) par rapport aux rats traités par INH/ RIF (**Figure 26**). La quercétine utilisé comme une référence dans cette étude a aidé à la préservation des paramètres antioxydants : CAT (81.11%), SOD (88,61%), POD (86%), GST(65,52%), GPx (62,2%) ainsi que le GSH (88,82%).

Ces résultats confirme l'effet antioxydant et hépatoprotecteur de l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* (BELD) vis-à-vis la toxicité induit par le traitement combiné de INH/ RIF en neutralisant la peroxydation lipidique et ses produit toxique en augmentant la capacité du système de défense antioxydant enzymatique (SOD, CAT, POD, GST, GPx) et non enzymatique (GSH).

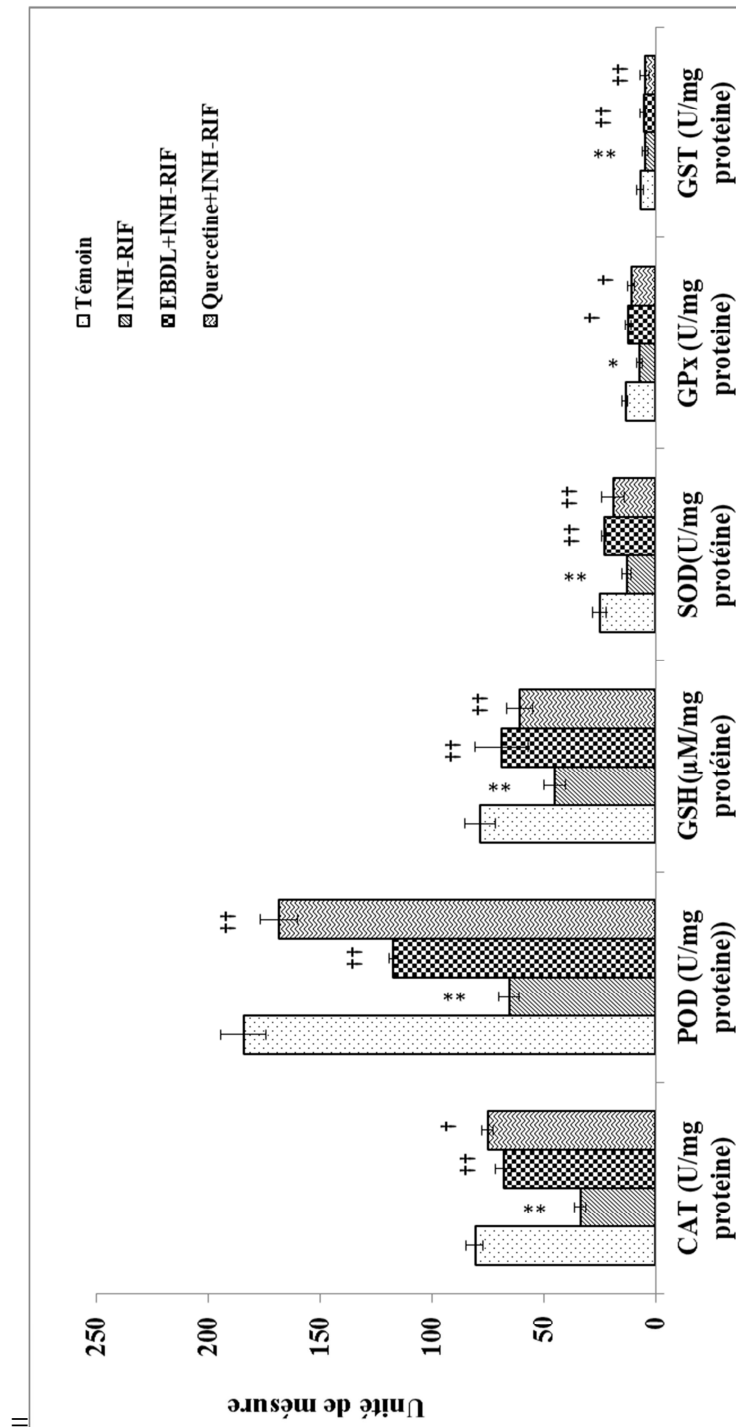


Figure 26: L'effet de l'extrait butanolique de *Lifalco dielsii* (BELD) sur les antioxydants du foie. GSH : Glutathion réduit, SOD : superoxyde dismutase. CAT : catalase, POD: peroxydase, GPx: Glutathion peroxydase, GST: Glutathion transferase. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ par rapport au groupe témoin, † $p \leq 0,05$ et †† $p \leq 0,01$ par rapport au groupe (RIF-INH), Valeurs exprimées en Moyenne \pm SD (n=6),

4. Effet de BELD sur le stress nitrosatif et apoptotique

Les taux de paramètres du stress nitrosatif hépatique chez les rats recevant l'INH-RMF a significativement augmenté ($p < 0.01$) par rapport aux témoins. Le traitement des rats avec l'BELD (200 mg/kg) a corrigé d'une manière efficace le taux du NO à 63 %, de protéines carbonylées (65%) et de nitrosothiol hépatique (71.45%) Le rétablissement des paramètres du stress nitrosatif hépatique est comparable à celui observé dans le cas du traitement des rats par la quercetine (**Figure 27**). En ce que concerne l'activité de la caspase-3, aucune variation significative n'est observé entre les rats témoins et ceux traités par INH/ RIF de même aucune signification enregistré entre les rats traités par la quercetine et BELD et par rapport aux rats intoxiqués par INH/ RIF seul (**Figure 27**).

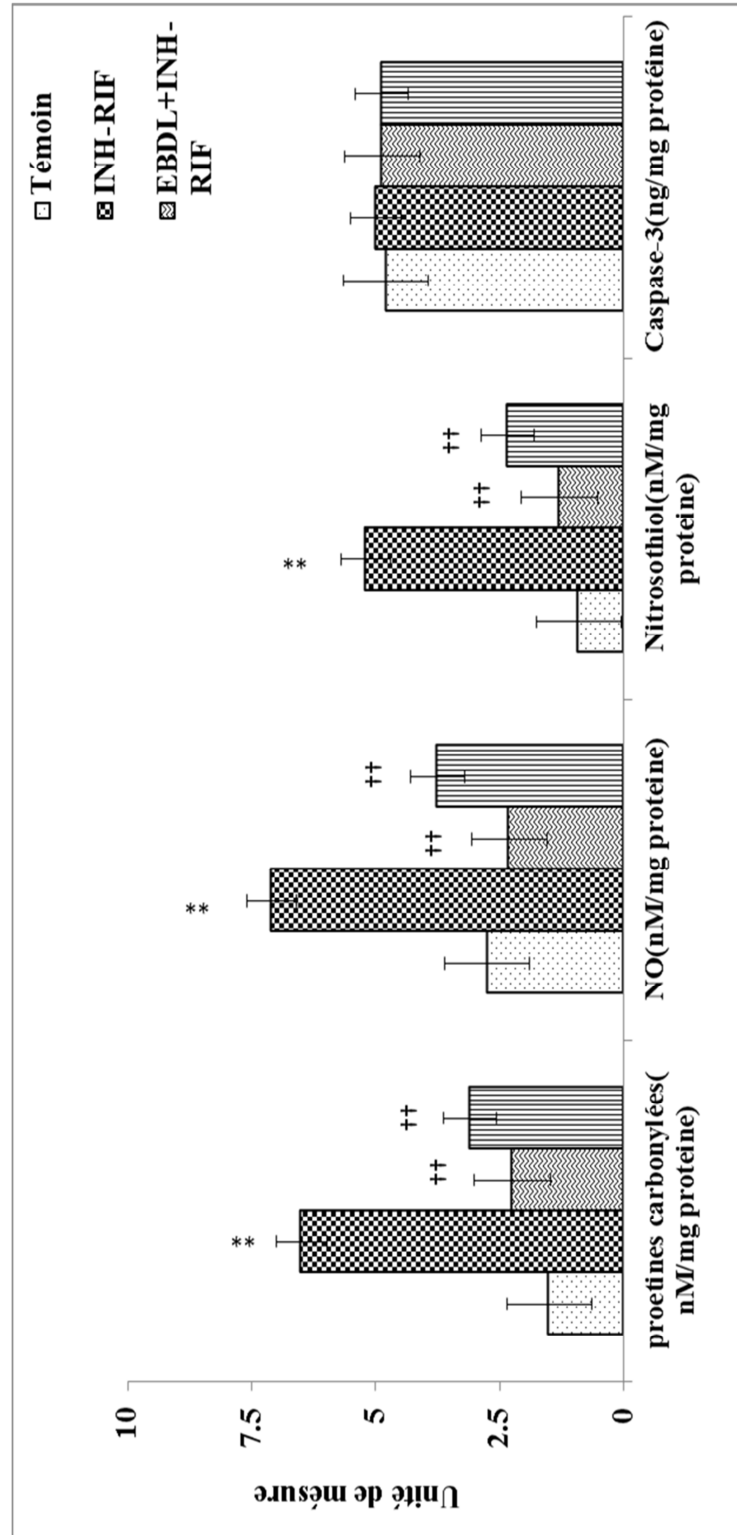
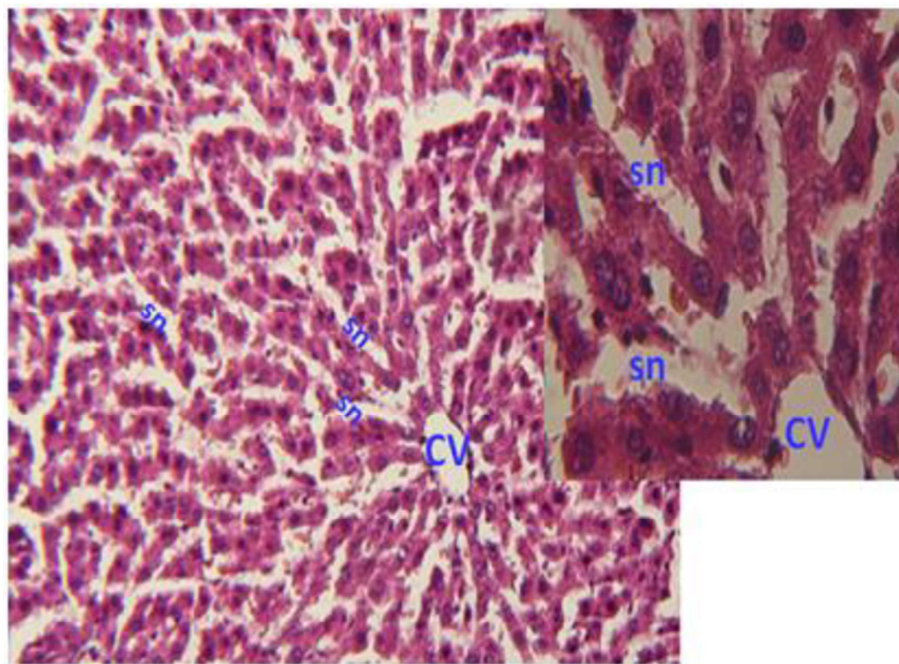


Figure 27. L'effet protecteur de BELD (200 mg/kg) sur le stress nitrative hepatic. NO :oxyde de nitrite, protines carbonylées et nitrosothiol. ** $p \leq 0,01$ par rapport au groupe témoin, †† $p \leq 0,01$ par rapport au groupe (RIF-INH), Valeurs exprimées en Moyenne \pm SD (n=6),

5 . Effet sur l'histologie du foie

L'analyse histologique après coloration avec l'hématoxyline- eosine des fragments du foie des rats de groupe témoin a montré une architecture cellulaire normale qui se caractérise par l'arrangement des hépatocytes autour de la veine centrale avec triade portale et espaces sinusoïdaux normaux (**Figure 28 A,a**).



(A, a)

Figure 28A,a: Histologie du foie des rats du groupe témoin

CV : veine centrale, sn: sinusoïde

H&E(100x et 400x)

Cependant, les coupes histologiques du foie des rats intoxiqués par l'INH et RIF présentait des altérations histopathologiques sévères, telles que nécrose hépatique et dilatation des sinusoides, accumulation de graisse (stéatose) et inflammation massive (infiltrats inflammatoires mononucléaires dans la région de la triade portale) (**Figure 28Bb**).

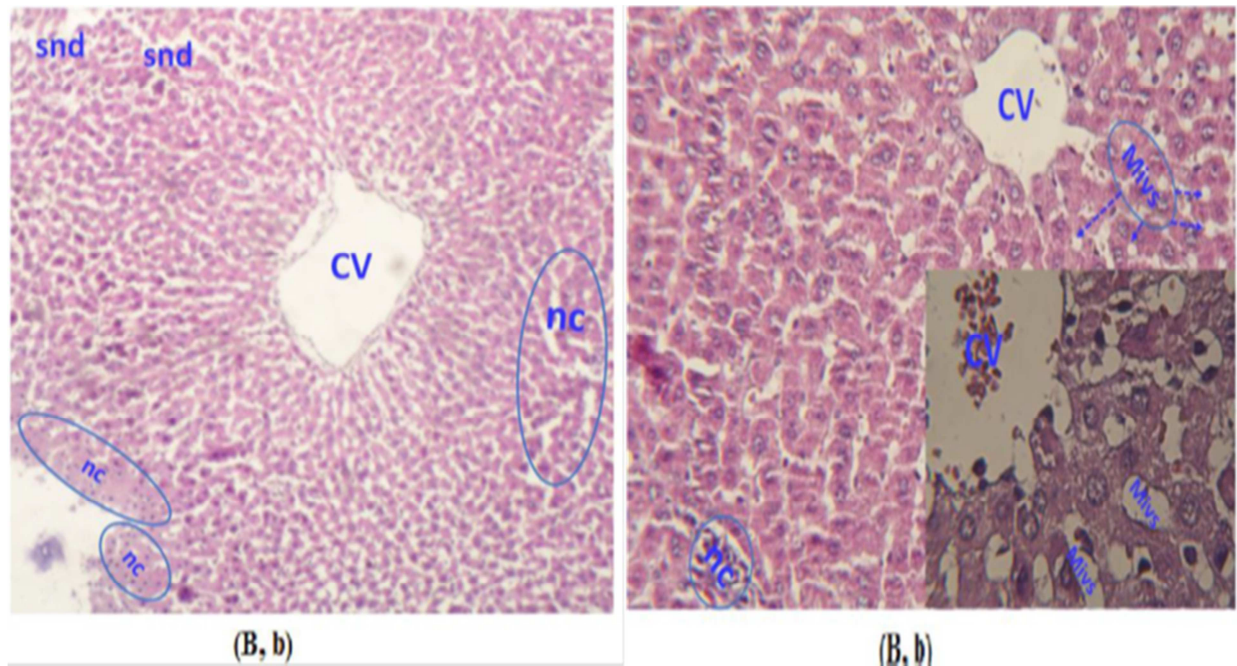
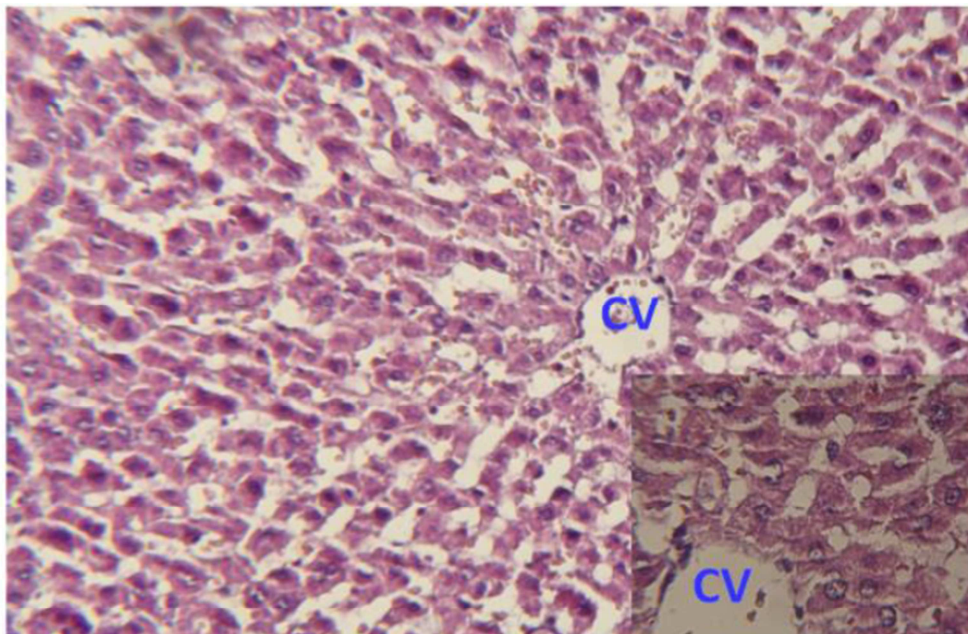


Figure 28B,b : Histologie du foie des rats du groupe traité par l'INH/ RIF

CV : veine centrale, sn: sinusöide, nc: necrose Mivs: microvésicules

H&E(100x et 400x)

Le co-traitement avec 200 mg/kg de l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* (BELD) a réduit les changements histopathologiques induits par l'INH/ RIF, dont on observe moins de dégénérescence graisseuse des hépatocytes et l'absence de nécrose (**Figures 28, C,c**). le co-traitement à la quercétine améliore également les modifications histopathologiques induits par l'INH/ RIF (**Figure28, D,d**). L'observation histologique du foie confirme les résultats des mesures des paramètres biochimiques et du profil antioxydant et confirme encore le potentiel hépatoprotecteur l'extrait butanolique de *Lifalgo dielsii* (BDEL).



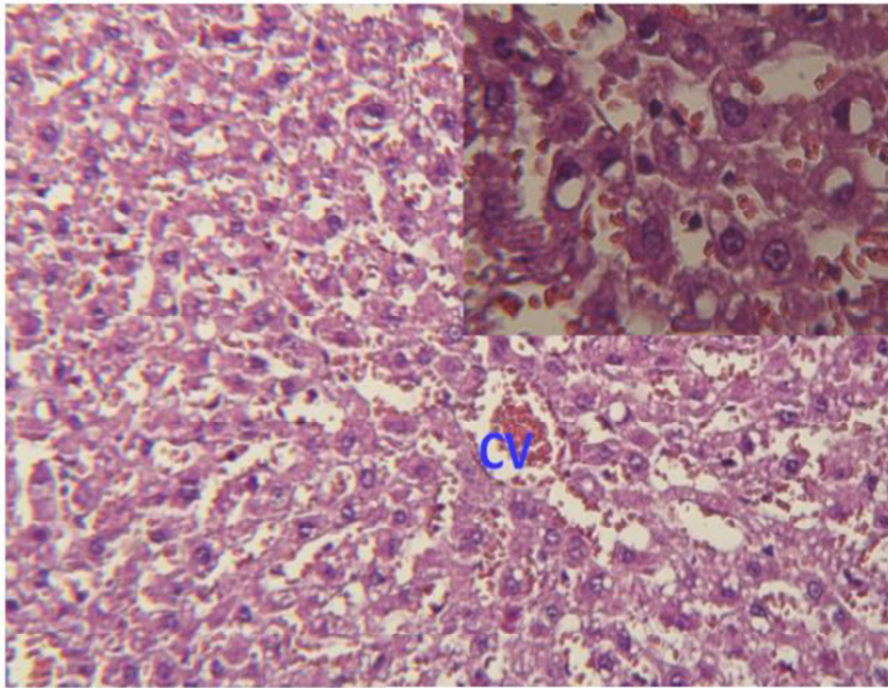
(C, c)

Figure 28C,c : Histologie du foie des rats du groupe traité par : l'extrait butanolique de

Lifalgo dielsii (BELD)+INH/ RIF

CV : veine centrale, sn: sinusöide

H&E(100x et 400x)



(D, d)

Figure 28D,d : Histologie du foie des rats du groupe traité par : Quercetine+INH/ RIF

CV : veine centrale, sn: sinusöide

H&E(100x et 400x)

DISCUSSION

Discussion

L'isoniazide (INH) et la rifampicine (RIF) étant les médicaments de première intention utilisés en chimiothérapie antituberculeuse, on sait qu'ils sont associés à l'hépatotoxicité. (Hassan *et al.*, 2015). La fréquence de cette hépatotoxicité est accrue lorsque ces médicaments sont utilisés en association, produire directement ou indirectement de l'acétylhydrazine et de l'hydrazine par une série d'enzymes, y compris le cytochrome P450 et pourrait induire le stress oxydatif conduisant à l'hépatotoxicité (Lee and Boelsterli, 2014). La RIF est connu par son effet inducteur qui provoque une formation accru des métabolites toxiques (Adithan *et al.*, 2016). Dans la présente étude, les animaux traités avec l'INH et le RIF ont développé une lésion hépatique qui s'est manifestée par une augmentation significative du taux sérique d'enzymes hépatiques AST, ALT, ALP et LDH et de la bilirubine par rapport aux animaux témoins. La bilirubine produit de la dégradation de l'hémoglobine par le foie. Cette augmentation peut être attribuée à des dommages structuraux hépatiques (Metushi *et al.*, 2011) et d'inhibition de la sécrétion biliaire (Reddy *et al.*, 2006 ; Thonda *et al.*, 2012).

La mesure des taux de la bilirubine peut refléter l'une des fonctions importantes du foie (Ravikamur *et al.*, 2015). Des taux sériques élevés d'ALP et de bilirubine donnent une indication de lésion hépatobiliaire, en particulier l'interruption de l'écoulement de la bile par le foie. Inversement, l'administration de BELD a modulé ces événements stimulés par le sérum. En concomitance, l'administration d'extrait de BELD à la dose de 200 mg/kg améliore la fonction hépatique en diminuant significativement les taux sériques du TGO et TGP, ce qui indique l'effet hépatoprotecteur de BELD qui pourrait être dû à la stabilisation de la membrane plasmique et réparation des lésions tissulaires hépatiques causées par l'administration d'INH et de RIF.

Le métabolisme anormal des lipides peut conduire à l'élévation du niveau de substances grasses, en grande partie le cholestérol et les triglycérides dans la circulation sanguine, entraîne une hyperlipidémie (**Ginsberg *et al.*, 2016**). La présente étude a montré une hyperlipidémie marquée et une augmentation marquée des triglycérides hépatiques chez les rats traités par INH/ RIF. Il a été rapporté que l'INH est l'un des médicaments favorisant le développement de lésions hépatiques liées à une perturbation du métabolisme lipidique (**Adebayo *et al.*, 2017**). Nos résultats sont en accord avec ceux de ceux qui ont déclaré que l'exposition INH/ RIF peut entraîner une perturbation du métabolisme des lipides et une élévation du cholestérol sérique (**Pengcheng *et al.*, 2016**). Le trouble majeur rencontré dans l'hépatotoxicité induite par les médicaments antituberculeux est l'accumulation de graisses dans le foie, qui se développe soit en raison d'un apport excessif de lipides au foie ou d'une interférence avec le dépôt lipidique (**Ramanathan and Sivanesan, 2017**). **Lian *et al.* (2017)** ont révélé que la liaison covalente des produits réactifs aux composants hépatocytaires initie l'inhibition de la sécrétion des lipoprotéines et donc de l'augmentation des lipides hépatiques totaux du foie de rats traités à l'INH/ RIF peut être due à un blocage de la biosynthèse et / ou de la sécrétion des lipoprotéines (**Ginsberg *et al.*, 2006**).

L'hypertriglycéridémie pouvant entraîner une enzyme hépatique induction, qui induit en outre l'activité des enzymes de régulation dans la biosynthèse des triglycérides (**Wang *et al.*, 2017**). Plusieurs études ont révélé que l'hydrazine, qui est l'un des métabolites l'INH, peut entraîner une accumulation marquée de lipides, une dégénérescence micro-vésiculaire et une stéatose reflétant une augmentation des acides gras libres hépatiques et une accumulation de triglycérides. Il a été rapporté que des doses élevées et faibles de la RIF peuvent également perturber le profil lipidique (**Ramanathan and Sivanesan, 2017**).

La stéatose peut résulter d'une altération de la β -oxydation des acides gras , d'une mobilisation accrue des acides gras , à une augmentation de la synthèse des triglycérides ou d'une diminution de la sécrétion de lipoprotéines riches en triglycérides (**Rabinowich and Shibolet, 2015**). Nos analyses histologiques de foie confirment les résultats biochimiques obtenus ci-dessus et a également révélé une accumulation de graisses hépatiques (micro-stéatose vésiculeuse) chez les animaux traités à l'INH/ RIF. Dans la présente étude, le traitement avec BELD a modulé les altérations lipidiques en maintenant les niveaux TG, LDL, HDL et Cholesterol à des valeurs proches de la normale, réduit les altérations histopathologiques et le degré de stéatose. Comme mentionné ci-dessus, le traitement avec BELD a clairement ramené le taux de bilirubine à un niveau proche de la normale, suggérant ainsi que les composants de BELD peuvent être efficaces sur la réduction de la synthèse du cholestérol et ainsi provoquer une augmentation des taux de HDL.

Remarquablement, l'association d'INH/ RIF et de BELD a entraîné une normalisation l'ensemble de paramètres lipidiques dosés, ce qui peut indiquer une stimuler la β -oxydation des acides gras et qui à son tour réduire la biosynthèse des triglycerides dans le foie. Le mécanisme par lequel BELD a réduit le taux de cholestérolémie pourrait être dû à la stimulation de la 7- α -hydroxylase responsable de la conversion du cholestérol en acide biliaire à la suite de (**Khan et al., 2016; Lv et al.,2016**). Il a été rapporté que la régulation des taux des paramètres du profil lipidique par les polyphénols pourrait être due à un ou plusieurs mécanismes, les mécanismes sous-jacents à l'effet hypolipémiant des polyphénols pouvant impliquer l'inhibition de la synthèse et de la sécrétion des lipoprotéines (**Benn et al., 2015**), la réduction de l'expression du récepteur LDL (**Nahan et al., 2011**).

Bawazeer et al.(2017) ont cité que les catéchines exerceraient une influence directe sur les niveaux de LDL et de HDL en régulant à la hausse l'activité de liaison aux récepteurs LDL des cellules HepG2. **Seyed et al. (2016)** ont montré que les flavonoïdes de *Cinnamomum zeylanicum* peuvent agir en rendant les cellules hépatiques plus efficaces pour éliminer le LDL-C du sang en augmentant les densités de récepteurs LDL dans le foie et en se liant à l'apolipoprotéine. La réduction de la biosynthèse du cholestérol cellulaire est souvent associée à une activité accrue du récepteur des LDL, qui à son tour conduit à l'élimination du cholestérol LDL du plasma, ce qui entraîne une diminution de la concentration plasmatique de cholestérol (**Yamomto et al., 2005 ; Seyed et al .,2016**).

Récemment **Jia-Hui.(2016)** a mis en évidence le rôle de métabolites de INH de moduler certain facteur tel que Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (γ) impliqué dans le métabolisme lipidique. Dans la présente étude, le mécanisme hypolipidémique de BELD serait probablement responsable de la préservation de l'homéostasie du profil lipidique. Comme il est bien connu, les cellules ont développé un ensemble de mécanismes de défense bien coordonnés comprenant des molécules antioxydantes telles que le GSH et des enzymes antioxydantes, qui agissent en synergie pour détoxifier la lésion oxydative en piégeant les radicaux libres d'oxygène. Bien que l'INH et la RIF soient potentiellement des médicaments hépatotoxiques, les mécanismes moléculaires précis derrière leurs effets indésirables ne sont pas entièrement compris. L'INH est métabolisé en acétylisoniazide via la N-acétyltransférase-2 hépatique (**Teixeira et al., 2013 ; Pengcheng et al., 2016**). À son tour, l'acétylisoniazide est hydrolysé en acétylhydrazine, qui est oxydée par le cytochrome P450 pour former des intermédiaires hépatotoxiques (**Zhai et al., 2008**). De plus, plusieurs études ont démontré que la RIF augmente la toxicité de l'INH, probablement en augmentant la formation de son métabolite toxique hydrazine (**Sarich et al., 2015**).

En plus des modifications lipidiques, l'exposition à l'INH et RIF provoque un stress oxydatif (Sodhi *et al.*, 1997). La réduction de la fonction antioxydante hépatique a également été suggérée comme l'un des principaux mécanismes d'hépatotoxicité causée par l'INH et la RIF (Imir *et al.*, 2012). Il a été rapporté que les métabolites de l'INH peuvent être convertis en produits réactifs, provoquant un stress oxydatif. L'exposition aux radicaux libres peut activer certaines des voies de transduction du signal, l'intensification du stress oxydatif renforce l'influence des acides gras non essentiels qui, à leur tour, augmentent les taux sériques et tissulaires de cholestérol et de triglycérides (Wang *et al.*, 2017). Imir *et al.* (2012) ont mentionné que l'oxydation acides gras peut générer H₂O₂ et des acides dicarboxyliques potentiellement toxiques. La peroxydation des lipides accumulés conduit à la formation de sous-produits réactifs toxiques de l'aldéhyde (Favier, 2003).

Dans la présente étude, l'implication du stress oxydatif dans le traitement INH/ RIF, est mise en évidence par l'augmentation marquée des niveaux de peroxydation à savoir MDA, 4HNE, LHP et H₂O₂ chez les rats traités par INH/ RIF. Les produits activés peuvent se lier par covalence à des macromolécules et initier une chaîne d'événements conduisant à une dégradation peroxydative dans les phospholipides membranaires et à l'accumulation de produits d'oxydation dérivés du lipide (MDA) qui causent des lésions hépatiques et une défaillance du système anti-peroxydatif (Adebayo *et al.*, 2017).

Lorsque les composés oxydants ciblent les lipides, ils peuvent initier le processus de peroxydation lipidique, les principaux produits primaires de la peroxydation lipidique étant les hydroperoxydes lipidiques qui sont produits durant la phase de propagation constituant le principal produit primaire du processus de peroxydation lipidique. Le groupe LOOH peut être attaché à diverses structures lipidiques, par exemple des acides gras libres, du triacylglycérol et des phospholipides (Pengcheng *et al.*, 2016), la réaction en chaîne des lipides pouvant produire de multiples molécules dégradées, telles que : le MDA qui est reconnu comme étant

un biomarqueur de la peroxydation lipidique (**Mateos *et al.* 2005**) et le 4-hydroxy-nonéanal (4-HNE) qui est une molécule généralement formée dans différents systèmes biologiques en réponse aux stimuli de la peroxydation lipidique, suite à une oxydation de la série *n-6* des acides gras polyinsaturés (**Porter and Caldwell, 1995**). Les 4-HNE sont les produits les plus importants durant la peroxydation lipidique car ils sont produits en quantités relativement importantes (**Ayala *et al.*, 2014**).

Les niveaux élevés de acides gras libres indiqués dans nos résultats peuvent être en partie dus à la dégradation des lipides oxydatifs, qui peut augmenter la synthèse d'autres lipides majeurs et activer la peroxydation microsomale dépendante du NADPH ou du NADH (**Imir *et al.*, 2012, Yakov *et al.*, 2017**). Nos résultats ont montré que les changements de peroxydation lipidique chez les rats traités par INH et RIF s'accompagnaient également d'une augmentation du taux de H₂O₂ hépatique qui, en présence de fer (réaction de Fenton conduisant à la génération OH) oxydait les lipides en hydroperoxy produits, entraînant ainsi des dommages au foie (**Gerard-Monnier *et al.*, 1998**).

Le niveau élevé de H₂O₂ dans le foie, démontré dans la présente étude, a également été associé à une diminution concomitante des activités à la fois de la CAT et de la POD qui sont impliquées dans l'élimination des peroxydes. Le traitement avec BELD a inhibé de façon marquée la peroxydation lipidique et a modulé le taux de paramètres associés (MDA, 4-HNE, LHP et de H₂O₂), éventuellement en neutralisant les radicaux libres et les métabolites toxiques de INH d'attaquer les acides gras polyinsaturés et en interrompant les réactions en chaîne. Ces dommages oxydatifs induits provoquent la destruction et l'endommagement de la membrane cellulaire entraînant sa rupture et la libération subséquente du contenu cytosolique (Transaminases et ALP).

Une approche logique pour prévenir les lésions hépatiques induites par l'INH / RIF pourrait être la potentialisation de la machinerie de défense antioxydante de les hépatocytes pour protéger le foie contre ces médicaments offensants. Dans la présente étude, un traitement par BELD (200 mg /kg) pendant 14 jours a prévient la progression de la lésion hépatique induit par l' INH et la RIF. Cette protection est confirmée par la diminution des taux élevés de MDA, 4-HNE, LHP et de H₂O₂). De même, on a observé que la diminution de MDA, 4-HNE, LHP et de H₂O₂ suite au traitement par BELD (200 mg / kg) s'accompagnaient également d'une augmentation concomitante des activités antioxydante de la SOD, CAT et POD, GPX et GST et du taux de la GSH impliqués dans l'élimination des radicaux libres et métabolite toxique de l'INH. Ces résultats indiquent clairement que BEDL exerce un effet antioxydant et hépatorotecteur comparable à celui de la quercétine contre le stress oxydatif et induit par l'INH/ RIF. La quercétine agit en piégeant les métabolites réactifs et les radicaux hydroxyles (Laughton *et al.*, 1989) et en prévenant leurs interactions avec les macromolécules cellulaire (José, 2011 ; Cherrak *et al.*, 2016).

Nos résultats peuvent soutenir l'effet hépatoprotecteur de la quercetin vis-à-vis de la toxicité induite par ces deux médicaments (Qader *et al.*, 2014). Le traitement des rats par l'extrait BELD confirme que cet extrait a un effet anti- oxydant en réduisant les taux de la MDA, 4-HNE, LHP et de H₂O₂. De même, l'extrait BELD améliore les taux de système antioxydant hépatique tel que la SOD, CAT et POD, GPX, GST et la GSH d'une façon significative et comparable à celle de la quercetine. Les métabolites bioactives présents dans cet extrait contribuent probablement à cet effet en inhibant la formation hépatique de métabolites toxiques de l'INH, ceci a pour conséquence l'inhibition de la peroxydation lipidique et l'amélioration de la situation du stress observé. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres travaux récents (Santhosh *et al.*, 2017 ; Hussain *et al.*,2018)

Biologiquement, un déséquilibre entre les ROS et les RNS peut entraîner un stress cellulaire de type oxydatif et nitrosatif (**Diers *et al.*, 2013**). Ce type de stress peut entraîner une augmentation de l'expression des facteurs de transcription qui favorisent l'expression accrue d'iNOS et le stress nitrosatif (**Cardwell et Ping, 2002**). Dans notre étude la surproduction d'oxyde nitrique hépatique étant un marqueur de stress nitrosatif est impliqué dans l'hépatotoxicité induite par INH/ RIF. L'INH/ RIF qui réduit les activités des enzymes antioxydantes peut par conséquent nuire à la protection contre les ROS / RNS, qui peut éventuellement causer des dommages oxydatifs aux lipides membranaires (peroxydation des lipides) et des dommages nitrosatifs aux protéines (**Hassan *et al.*, 2016**). La génération d'O₂^{•-} et de NO peut conduire à la production de peroxynitrite (ONOO⁻) nuisible. Cette molécule hautement réactive peut entraîner une S-nitrosylation et une nitration de la tyrosine des protéines avec un changement concomitant de leur fonction (**Evan *et al.*, 2010**). Dans certains cas, les interactions entre les nitrosants et les oxydants peuvent produire des produits plus toxiques que leurs molécules mère (**Metushi *et al.*, 2016**).

La teneur en S-nitrosothiol est une autre mesure quantitative de l'altération nitrosative des protéines (**Diers *et al.*, 2011**). Les nitrosothiols intracellulaires représentent un pool de stockage de thiols et NO^o et de ce fait les nitrosothiols peuvent également avoir une importance pour la régulation de l'état redox des protéines à la surface cellulaire (**Stamle *et al.*, 1992**). Dans notre étude, on a enregistré une augmentation concomitante des nitrosothiols avec une baisse des thiols non protéiques chez les rats prétraités par INH/ RIF. La liaison réversible de NO^o aux thiols est une modification covalente connue sous le nom de nitrosylation, représente la plupart des effets de NO^o sur l'activité des protéines. En outre, il a été démontré que le NO^o peut augmenter les lésions cellulaires en diminuant les niveaux de GSH intracellulaire (**Zhang *et al.*, 2012**).

La fixation irréversible de NO^o aux thiols, une modification covalente connue sous le nom de S-nitrosylation, représente la plupart des effets de NO^o sur l'activité des protéines (Nègre-Salvayre, 2008). Il est bien admis que les nitrosothiols représentent un métabolite plus stable du NO qui peut être stocké ou transporté (Robinson *et al.*, 2001). Nos résultats ont également révélés que le taux élevé de la carbonylation de protéines hépatique peut se produire suite à l'administration de INH / RIF chez le rats et cette formation accru de carbonyl est probablement due à l'oxydation directe de chaînes latérales d'acides aminés (Tafazoli *et al.*, 2008). Cette carbonylation de protéines pourrait être expliqué par le fait que les produits de peroxydation lipidique (MDA et 4-HNE) se liées avec les protéines et peuvent avoir des effets d'inactivation sur ces dernières (Cai *et al.*, 2013). L'administration de l'extrait EBLD aux rats recevant simultanément l'INH et la RIF a atténué significativement le taux de la carbonylation de protéines hépatiques. Cet effet pourrait être lie à la capacité de l'extrait de piéger le NO^o formé durant la toxicité et cela est en accord avec d'autres travaux confirmant le rôle des extraits riches en polyphénols de réduire les dégâts oxydatifs aux protéines (Hassan, 2012 ; Martínez-Palma *et al.*, 2017).

L'hépatotoxicité, y compris les lésions hépatiques induites par les antituberculeux, est souvent accompagnée de mort cellulaire. Ce dernier est typiquement entraîné par l'apoptose ou la nécrose, qui diffèrent substantiellement en fonction de critères biochimiques et morphologiques. Selon ceci, l'hépatotoxicité induite par un médicament repose sur trois étapes consécutives, à savoir une agression cellulaire initiale qui conduit à l'apparition d'une transition de perméabilité mitochondriale, qui à son tour finit par éclater au début de la mort cellulaire. Ce dernier peut se manifester sous forme d'apoptose ou de nécrose (Vinken *et al.*, 2013 ; Vinken *et al.*, 2014). L'apoptose est un processus génétiquement programmé et bien orchestré qui peut être déclenché par 2 voies, à savoir par la cascade intrinsèque médiée par la mitochondrie ou par la voie extrinsèque médiée par le récepteur de la mort (Enari *et al.*,

1998). Les deux voies s'appuient sur l'activité protéolytique des protéases à cystéine, les caspases, qui sont exprimées en pro-enzymes inactives activées par clivage protéolytique. L'activation de la voie caspase-3 est une caractéristique de l'apoptose et peut être utilisée dans des dosages cellulaires pour quantifier les inhibiteurs activateurs de la «cascade de la mort». (Lavrik *et al.*, 2005). La réponse dépend à la fois du temps et de la concentration, ce qui suggère que plusieurs voies jouent un rôle dans le déclenchement de l'activation de la caspase-3 (Bhadoria *et al.*, 2010). Dans notre étude, aucune activation pertinente des caspases ne peut être trouvée suite au traitement combiné de l'INH / RIF à la dose choisie. Ces résultats supportent les autres travaux qui montrent que l'hépatotoxicité de l'INH / RIF chez le rat implique la mort cellulaire nécrotique et non la caspase dépendante.

À l'appui de nos résultats actuels, plusieurs études ont démontré l'effet protecteur de certains polyphénols sur la toxicité hépatique et l'amélioration de la défense antioxydante hépatocytaire (Ting *et al.*, 2014 ; Bahmani *et al.*, 2015). L'effet hépatoprotecteur de la quercétine sur la lésion hépatique est bien évident, ce qui inhibe significativement l'élévation de ces niveaux d'enzymes chez les rats avec une hépatotoxicité induite par INH/ RIF traitée à la quercétine en maintenant l'intégrité structurale de la cellule. L'effet hépatoprotecteur de BELD pourrait être dû à la présence de substances bioactives de type polyphénols douées d'activité antioxydante. Aissaoui *et al.* (2014) ont confirmé la richesse de BELD en polyphénols (81,09 mg GAE/g extrait) et que cet extrait est doté d'un pouvoir antioxydant considérable. Ces résultats concordent avec ceux observés lors de l'étude de l'activité hépatoprotectrice de *Erythrina indica*, *Amaranthus graecizans* contre les lésions hépatiques induites par l'INH/ RIF chez le rat (Mohd *et al.*, 2017, Saiga *et al.*, 2017). Une autre étude a montré l'effet hépatoprotecteur d'une plante contre la toxicité de l'INH/ RIF est étroitement lié à la présence de molécules antioxydantes (Mirza *et al.*, 2017).

Les antioxydants sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Chaque molécule antioxydant ne peut réagir qu'avec un seul radical libre et par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressources antioxydants. Les antioxydants ont un rôle bénéfique pour la santé grâce à la protection contre les vieillissements, réduisent les risques de cancers et de maladies cardio-vasculaires (**Ahmadinejad et al., 2017; Han et al., 2017**).

Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant des plantes médicinales ont été examinées et regroupées selon leurs principes (**Alam et al., 2013**). In vitro, l'activité anti oxydante de l' BELD a été évaluée en utilisant la méthode FRAP .Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible qui représente un indicateur significatif du pouvoir antioxydant de la plantes. La présence des réductants dans les extraits provoque la réduction de fer Fe^{3+} complexe ferricyanide à la forme ferreux Fe^{2+} . La chélation de fer est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe^{2+} -Ferrosine, l' BELD été capable d'exercer un effet remarquable sur l'inhibition de la formation de ce complexe. La capacité antioxydant totale et un autre test réaliser in vitro pour évaluer l'activité antioxydant de l'EBLD, qui est selon les résultats obtenue il possède une forte activité antioxydant. L'BELD possède une activité inhibitrice du radical hydroxyle ($^{\circ}OH$) et l'oxyde d'azote (NO°), qui est basé sur la capacité des molécules de l'extrait de piéger le OH^{\bullet} et NO° . La peroxydation de l'acide linoléique est déterminée selon la méthode de thiocyanate ferrique. Le procédé de phosphore molybdène est basé sur la détermination quantitative de la capacité antioxydant, par la formation d'un complexe de phosphomolybdène. Le procédé de réduction est basé sur le principe d'augmentation de l'absorbance des mélanges réactionnels. L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation de l'activité antioxydante .

La combinaison de ces méthodes a confirmé le potentiel antioxydant de notre extrait d'une manière proche celle de standard utilisé pour cette méthode *in vitro*. Nos résultats *in vitro* démontrent clairement la capacité de BELD à agir comme un transfert direct d'électrons, un effet d'élimination des $^{\circ}\text{OH}$ et NO° , l'élimination des peroxydes et une rupture de chaîne, probablement en chélatant le métal, inhibant ainsi l'interaction entre le métal et les lipides par la formation de complexes insolubles avec l'ion ferreux qui à son tour peut mettre fin à la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique (**Rice Evans, 1989**). Nos résultats d'activité antioxydante *in vitro* corrobore avec ceux de **Aissaoui et al.(2014)** et que cette activité est probablement due à la présence de polyphénols dans BELD. Cela pourrait justifier l'effet hépatorotecteur observé chez les rats co-traité par BELD contre l'INH et la RIF. Nous avons suggéré que les phytoconstituants bioactifs BELD pourraient contribuer synergiquement par divers mécanismes cellulaires dans l'effet hépato protecteur contre les antituberculeux.

CONCLUSION ET PRESPECTIVES

L'effet antioxydant et hépatoprotecteur de l'extrait de *Lifago dielsii* (Asteraceae) a été évalué dans ce travail. Les résultats obtenus montrent que l'extrait a une activité antioxydante et hépatoprotectrice. Cette activité est reliée à la présence des composés polyphénoliques. *In vivo*, l'extrait BELD montre une activité anti-oxydante et hépatoprotective importante contre le déséquilibre du statut redox cellulaire a été étendue à une hépatotoxicité induite par l'isoniazide (INH) et rifampicine (RIF), médicament antituberculeux. Après la mise en évidence de la toxicité de ces antituberculeux exprimée par un dysfonctionnement hépatique (libération dans le sang des transaminases hépatiques) et un stress oxydant, cette étude a permis de montrer le potentiel antioxydant de cet extrait. Les paramètres biochimiques sériques liés à la structure et à la fonction hépatique ont montré des changements significatifs des transaminases, LDH et la bilirubine totale et du bilan lipidique chez les rats intoxiqués.

Des changements histopathologique comme la formation des microvésicules lipidiques et des foyers de nécrose dans le foie sont observés surtout chez les rats traités par l'INH/ RIF. Le déséquilibre de la balance prooxydants / antioxydants au profit des ROS et le dysfonctionnement hépatique (fuite des transaminases et perturbation de bilan lipidique), obtenus après l'administration de INH/ RIF aux rats, est normalisé par un prétraitement avec l'extrait EBDL. Cet effet est exprimé encore une fois par la normalisation des paramètres antioxydant enzymatique et non enzymatique tel que le GSH. Cet équilibre redox constaté prévient une hausse des marqueurs de la lipidperoxydation (MDA, 4-HNE, LHP et H₂O₂) au niveau du foie qui reste fonctionnel suite à une normalisation des altérations de bilan biochimique et de l'histologie hépatique induit par le traitement combiné d l'INH/ RIF.

Ces perturbation oxydative sont jointement associées avec un stress nitrosatif qui est confirmé par l'augmentation considérable des taux de protéines carbonylées, nitrosthiole et de l'oxyde d'azote hépatique chez les rats traités par INH/ RIF. Ces paramètres de stress nitrosatif ont été efficacement renversés par le traitement avec l'EBLD et la quercétine (standard). Les potentialités antioxydantes *in vitro* de EBLD sont évaluées par divers mécanismes ; piégeage direct des radicaux libres par la méthode du piégeage de radical hydroxyle et de NO°, de la chélation de fer, de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique et de la capacité antioxydante totale par la méthode de phosphomolybdène. Les résultats *in vitro* ont révélé des activités antioxydantes par EBLD. Les capacités antioxydantes révélées *in vitro* sont en relation directe avec le contenu en métabolites secondaires de l'extrait EBDL et dépendent de l'ensemble des substances antioxydantes, de leur nature, leur quantité, leur structure et de toutes les interactions moléculaires qui peuvent agir de façon synergique pour faire augmenter cette activité. Cette étude suggère que les composés phénoliques sont les substances antioxydantes par excellence.

En fin, les antioxydants naturels des espèces végétales locales et particulièrement ceux provenant des *Lifago dielsii* (Asteraceae) peuvent être très utiles pour renforcer l'organisme dans le cas de situation de stress oxydatif et de prévenir les différentes pathologies survenues suite à une attaque radicalaire. Les résultats obtenus lors de cette étude sont intéressants, mais des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets. Ces études doivent être aussi orientées vers la détermination des composés actifs dans l'extrait de *Lifago dielsii* et l'évaluation leurs effets sur les mécanismes impliqués dans l'effet antioxydant et

hepatoprotecteur. De même, l'exploration de composés bioactifs de *Lifago dielsii* peuvent donner de l'espoir pour de nouveaux développements basés sur une compréhension croissante de la complexité et hautement redondante des mécanismes physiologiques impliqués dans la protection hépatique. Idéalement, une telle exploration et de la recherche conduira à un effet pharmacologique plus sûr et plus efficace traitement de l'hépatotoxicité médicamenteuse.

REFERENCES

Références

A

- **Adebayo AJ, Kehinde AJ, Adetokunbo OA, Olamide AE, Oluwatosin A.** Influence du traitement à l'isoniazide sur Microsomal peroxydation lipidique et antioxydant defense Systems de rats. *J. Drug Metab Toxicol.*2017, 3: 120.
- **Adithan C, Subathra A.** NAT2 gene polymorphism: covert drug interaction causing phenytoin toxicity. *Indian J Med Res.* 2016, 143(5):542-4.
- **Ahadpour M, Eskandari MR, Mashayekhi V, Haj Mohammad Ebrahim Tehrani K, Jafarian I, Naserzadeh P, Hosseini MJ** Mitochondrial oxidative stress and dysfunction induced by isoniazid: study on isolated rat liver and brain mitochondria. *Drug Chem Toxicol.* 2016,39(2):224-32.
- **Ahmadinejad F, Geir Møller S, Hashemzadeh-Chaleshtori , Bidkhorri G , Mohammad-Saeid J.** Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. *Antioxidants.* 2017, 6(3), 51-58
- **Aïssaoui H, Menad A, Mezhoud S, Ameddah S, Mekkiou R, Benayache S, Benayache F.** Phytochemical screening, quantitative analysis and antioxidant activity of *Lifago dielsii* Schweinj. & Muschl. (Asteraceae). *Inter J phyto.* 2014: 6 280-285.
- **Alam N, Jahan Bristi M, Rafiquzzaman S.** Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharma J.* 2013, 21(2): 43-152
- **Arethusa LP, Lima Scodro RG, Caleffi-Ferracioli KR, Dias Siqueira VL, Campanerut AZ, Lopes LK.** Mutations in catalase-peroxidase KatG from isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Mol Mod,* 2017: 23:121
- **Arts, IC, Hollman, PC.** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005,81, S317–S325.

- **Attri S, Rana SV, Vaiphei K, Sodhi CP, Katyal R, Goel RC, Nain CK, Singh K.** Isoniazid and rifampicin induced oxidative hepatic injury protection by N-acetylcysteine. *Hum Exp Toxicol.* 2000,19: 517-522.
- **Aviram M, Fuhrman B.** Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Acad Sci* 2002, 957:146–61.
- **Ayala A, Munoz MF, Arguelles S.** Lipid Peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longevity.* 2014: 1-31.

B

- **Bahmani M, Shirzad H, Rafieian S, Rafieian-Kopaei M.** Silybum marianum: Beyond Hepatoprotection. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2015, 20(4):292-301.
- **Barry CE.** Lessons from seven decades of antituberculosis drug discovery. *Curr Top Med Chem.* 2011,11(10):1216-25.
- **Bawazeer NA, Choudary H, Zamzami MA, Abdulaal WH, Zeyadi M, ALbukhari A.** Possible regulation of ldl-receptor by naringenin in hepg2 hepatoma cell line. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2016,14(1):278-287
- **Bedossa A.** Foie et médicaments. *Thérapie.*1996, 34-40.
- **Benhamou JP, Bircher J, McIntyre N, Rizzetto M, J Rodés J.** 2002. Hépatologie clinique. 2ème édition. Médecine Sciences, Paris.2002, pp 259-298.
- **Benn T, Kim B, Park YK, Yang Y, Pham TX, Ku CS, Farruggia C.** Polyphenol-rich blackcurrant extract exerts hypocholesterolaemic and hypoglycaemic effects in mice fed a diet containing high fat and cholesterol. *Br J Nutr.* 2015, 113(11):1697-703.

- **Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL.** Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 2006,26(10):1175-1186.
- **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation(3ème Ed).Lavoisier. Paris, 1999, pp199-388
- **Berry MN, Edwards AM.** The hepatocyte review. Kluwer Academic Publishers; London. 2000, pp. 281–300.
- **Berson A, Fromenty B, Pessayre D.** Rôle des mitochondries dans l'hépatotoxicité des médicaments. *La Lettre du Pharmacologue* .1999,13 (5) : 221-128.
- **Berson A, De Beco V, Letteron P, et al.** Steatohepatitis- inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxydation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998,114:764-74.
- **Bhandari R, Kaur IP.** Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of isoniazid-solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2013,441(2):202-12.
- **Bhadauria S, Mishra R, Kanchan MR, Tripathi C, Srivastava A, Tiwari A.** oniazid-induced apoptosis in HepG2 cells: Generation of oxidative stress and Bcl-2 down-regulation. *Toxi Mech Meth* . 2010, 20(5):23-29.
- **Bonnaud F, Zigani A.** Tuberculose. *Rev Prat* 2002,16:1809-20.
- **Bouchentouf R, El jastimi S, Benjelloun A.** Hépatotoxicité des antituberculeux : épidémiologie, mécanisme et conduite à tenir. *J Afr Hépat Gastro.*2011, 5(3) : 168-173.

- **Brossier F.** Mécanismes d'action et de résistance de l'isoniazide, un antituberculeux de première ligne. *J Anti-Infect.* 2011,(4) : 217-227
- **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 1999, 3ème Ed.Lavoisier. Paris, 199-388.

C

- **Cai Y, Yi J, Zhou C, Shen X.** Pharmacogenetic study of drug-metabolising enzyme polymorphisms on the risk of anti-tuberculosis drug. *PLoS One.* 2012;7(10):e47769.
- **Campbell E A, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA .**Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA Polymerase. 2011, 104(6): 901–912.
- **Chance B, Maehly AC.** Assay of catalase and peroxidases. *Methods Enzymol,* 1955, 11: 764-75.
- **Cherrak SA, Mokhtari-Soulimane N, Berroukeche F, Bensenane B, Cherbonnel A, Merzouk H.** In vitro Antioxidant *versus* Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation. *PLoS ONE,* 2016, 11(10): e0165575.

-
- **Church RJ, Wu H, Mosedale M, Sumner SJ, Pathmasiri W, Kurtz CL, Pletcher MT, Eaddy JS.** A systems biology approach utilizing a mouse diversity panel identifies genetic differences influencing isoniazid-induced microvesicular steatosis. *Toxicol Sci.* 2014,,140(2):481-92.
 - **Claiborne, A.** Catalase activity. In Greenwald, RA., Ed., *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research,* CRC Press,1985,pp: 283-284.

- **Cardwell O, Ping, P.** Nitric oxide induces nitration of protein kinase Cepsilon: a novel mechanism. *J Biol Chem.*2002, 277: 15021–15027.
- **Cook JA, Kim, SY, Teague, D.** Convenient colorimetric and fluorometric assays for S-nitrosothiols. *Anal Biochem.* 1996,238:150–158.

D

- **Dinis, T.C.P., and V.M.C. Madeira, L.M., Almeida. 1994.** Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem.phytomed.*1994, 6: 280-285.
- **Diers AR, Broniowska KA, Darley-Usma DG, Hogg N.** Differential regulation of metabolism by nitric oxide and S-nitrosothiols in endothelial cells, *Am J Physiol.* 2011,301:H803–H812.
- **Diers AR, Broniowska KA, Hogg N.** Nitrosative stress and redox-cycling agents synergize to cause mitochondrial dysfunction and cell death in endothelial cells. *Redox Biol.* 2013: 1–7.

E

- **Eidelman, R.A., Lamas, G.S., Hennerkens, C.H., 2002.** The new national education program guidelines. *Arch Intern Med.*2002, 162: 2033–2036.
- **Ellman GL.** Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959, 82(1): 70-77.
- **Evan I, Sahar M S, El-Gowilly S, Sherhaa O, Bistawroos AE.** Role of oxidative stress and nitric oxide in the protective effects of alpha-lipoic acid and aminoguanidine against isoniazid-rifampicin-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxi.*2010, 48:1869–1875.

-
- **Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Nagata S.** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998, 391: 43–50,

F

- **Fattinger K, Cattori V, Hagenbuch B, Meier PJ, Stieger B.** Rifamycin and rifampicin exhibit differential inhibition of the hepatic rat organic anion transporting polypeptides, Oatp1 and Oatp2. *Hepatology*.2000, 32, 82–86.
- **Fausto N, Campbell JS.** The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Devel.* 2003,120(1) : 117–130.
- **Folch, J, Lees S, Sloane S.** Stanely, A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.*1957, 226: 497-509.
- **Fromenty, B.** Drug-induced mitochondrial and metabolic toxicity: Mechanisms and deleterious consequences for the liver. *Reanimation.*2010, 19, 552-567.
- **Favier A.** Radicaux libres et pathologies oxydatif. *Act Chem.*2003.65-75

G

- **Garcia-Lafuente A, Guillamon A, Villares D.** Flavonoids as antiinflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res.* 2009,58(9):537-52
- **Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D.** Espèces réactives de l'oxygène. *Act chem.* .2017, 91-96
- **Georgieva N, Gadjeva V, Tolekova, A,** New isonicotinyl hydrazones with SSA protect against oxidative-hepatic injury of isoniazid.2004, *TJS* 2, 37–43.

-
- **Gerard-Monnier, D., I. Erdelmeier, K. Regnard, N. Moze-Henry, J.C. Yadan, and J.Ghezzi P, Jaquet V, Marcucci F, Schmidt HW.** The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects. *Br J Pharmacol.* 2017,174(12):1784-1796.
 - **Ginsberg HN, Zhang A, Hernandez O.** Metabolic Syndrome:Focus on Dyslipidemia. *Obesity.*2006, 14: 41S-49S.
 - **Gutteridge JM, Halliwell B.** Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med.*1999, 12, 93-95.

H

- **Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB.** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.*1974, 25;249(22):7130-9.
- **Halliwell B.** Reactive species and antioxidants. redox biology Is a fundamental Theme of aerobic Life. *Plant Physiol.* 2006,141(2): 312–322.
- **Halliwell B.** How to characterize an antioxidant: an update. *Bioch. Soc. Sym.*1995, 61: 85-91.
- **Han X, Shen T, Lou H.** Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int J Mol Sci.* 2007, 8(9): 950-988.
- **Hartkoorn RC, Sala C, Magnet SJ, Chen JM, Pojer F, Cole ST.** Sigma factor F does not prevent rifampin inhibition of RNA polymerase or cause rifampin tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 2010,192(20):5472-9.
- **Hassan HM, Guo HL, Yousef BA, Luyong Z, Zhenzhou J** Hepatotoxicity mechanisms of isoniazid: A mini-review. *J Appl Toxicol.* 2015;35(12):1427-32.

-
- **Hoechst, MR.**Rifadin. In: PDR Physicians' Desk Reference. Medical Economics Data, Oradell. 2000:1379–1382.
 - **Hussain Z, Kar P, Husain SA.** Antituberculosis drug-induced hepatitis: risk factors, prevention and management. *Indian J Exp Biol.* 2003, 41: 1226-1232.
 - **Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI.** The deoxyribose method: simple 'test tube' assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 1987, 165(1):215-219.
 - **Hassan HM, Guo H, Yousef BA, Guerram M, Hamdi AM, Zhang L, Jiang Z.** Role of inflammatory and oxidative stress, cytochrome p450 2e1, and bile acid disturbance in rat liver injury induced by isoniazid and lipopolysaccharide cotreatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016, 60(9):5285-5293
 - **Hassan HM.** Hepatoprotective effect of red grape seed extracts against ethanol-induced cytotoxicity. *Global j Biotech Biochem,* 2012, 7 (2): 30-37
 - **Hussain T, Subaiea GM, Firdous H.** Hepatoprotective Evaluation of *Trapa natans* against Drug-induced Hepatotoxicity of Antitubercular Agents in Rats. *Pharmacogn Mag.* 2018, 14(54):180-185.

I/J /K

- **Imir GM, Tetsuya N, Jack U.** Direct oxidation and covalent binding of isoniazid to rodent liver and human hepatic microsomes. *Chem Res Toxicol.* 2012, 25 (11): 2567–257.
- **Jia-Hui H, Cheng Z, Da-Gang Z, Lu L, Xi C, De-Xiang X.** Rifampicin-Induced Hepatic Lipid Accumulation: Association with Up-Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Mouse Liver. *PLoS One.* 2016, 11(11): e0165787.

- **Jong-Sun P, Young-Jae C, Ho Il Y, Junghan S, Choon-Taek L, Jae-Ho L.** Drug-induced Hepatotoxicity of Anti-tuberculosis Drugs and Their Serum Levels. *J Korean Med Sci.* 2015,30(2): 167–172.
- **Iseman MD, Madsen LA.** Drug-resistant tuberculosis. *Clin Chest Med.* 1989, 10(3):341-353.
- **José CR.** Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. *Eclet. Quím.* 2011, 36(2):13-20.
- **Khan SR, Morgan AG, Michail K, Srivastava N, Whittal RM, Aljuhani N, Siraki AG.** Metabolism of isoniazid by neutrophil myeloperoxidase leads to isoniazid-NAD(+) adduct formation. *Biochem Pharmacol.* 2016,106:46-55.

L

- **Labro MT.** Immunomodulatory effects of antibacterial agents. *Reanim.* 2006, 15 : 259–264.
- **Laporte F, Favre V, Savelli K, Huguet F, Canonge JM, Vie M, Pris J.** Leucémie aiguë et antituberculeux : difficultés thérapeutiques. *J Pharm Clin.* 2002,21(2):137-40.
- **Lavrik IN, Golks A, Krammer PH.** Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 2005, 115:2665-2672
- **Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Hoult JR** Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem. Pharmacol,* 1989, 38(17):2859-2860.
- **Lee KK, Boelsterli UA.** Bypassing the compromised mitochondrial electron transport with methylene blue alleviates efavirenz/isoniazid-induced oxidant stress and mitochondria-mediated cell death in mouse hepatocytes. *Redox Biol.* 2014, 2:599-609.

- **Liu C, Sun J, Lu Y, Bo Y (2016)** Effects of Anthocyanin on Serum Lipids in Dyslipidemia Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS ONE 11(9): e0162089.
- **Liaudet L.** Biologie oxydative et implications cliniques du peroxy-nitrite. Rev Med Suisse 2007,3 : 32769.
- **Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010,4(8):118-26.
- **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent, J Biol Chem. 1951,193: 265-275.
- **Lv O, Wang L, Li J, Ma Q, Zhao W** Effects of pomegranate peel polyphenols on lipid accumulation and cholesterol metabolic transformation in L-02 human hepatic cells via the PPAR γ -ABCA1/CYP7A1 pathway. Food Funct. 2016,7(12):4976-4983.

M

- **Marnett LJ.** Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutat Res. 1999, 424: 83-95.
- **Masubuchi Y, Nakayama S, Horie T.** Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatocyte injury in rats. Hepatology 2002,35:544–551.
- **Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L.** "Determination of malondialdehyde (MDA) by highperformance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005; 827(1): 76-82
- **Malti H, Merzouk B, Loukidi SA, Malti MA** Défenses antioxydantes enzymatiques au cours de l'obésité maternelle. Nut Clin Metab .2016, 30(3) : 281-301

-
- **Martínez-Palma NY, Dávila-Ortiz G, Jiménez-Martínez C, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I.** Chemopreventive and antioxidant effect of polyphenol free *spirulina maxima* and its hydrolyzed protein content: investigation on azoxymethane treated mice. *Pharmacogn Mag.* 2017,13:S164-S169
 - **Metushi I, Utrecht J, Phillips E.** Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now. *Br J Clin Pharmacol.* 2016, 81(6):1030-1036.
 - **Metushi IG, Sanders C, Acute Liver Study G, Lee WM, Utrecht J.** Detection of anti-isoniazid and anti-cytochrome P450 antibodies in patients with isoniazid-induced liver failure. *Hepatology* 2014, 59: 1084–1093.
 - **Metushi IG, Nakagawa T, Utrecht J.** Direct oxidation and covalent binding of isoniazid to rodent liver and human hepatic microsomes: humans are more like mice than rats. *Chem Res Toxicol.* 2012, 25: 2567-2576.
 - **Militante, J.D., and J.B. Lombardini.** Dietary taurine supplementation: hypolipidemic and antiatherogenic effects *Nut Clin Metab* .2016, 30(3) : 281-301
 - **Mirza KU, Mujahid M, Akhlaquer R, Azizur R.** The Role of *Tamarix gallica* Leaves Extract in Liver Injury Induced by Rifampicin Plus Isoniazid in Sprague Dawley Rats. *J Diet Suppl* .2016, 15 (1):43-51.
 - **Mohd M, Talib H, Hefazat H S, Arshad H.** Evaluation of hepatoprotective potential of *Erythrina indica* leaves against antitubercular drugs induced hepatotoxicity in experimental rats. *J Ayurveda Integr Med.* 2017,8(1): 7–12.
 - **Moncada S, Higgs A.** L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002–12.
 - **Monteiro TP, El-Jaick KB, Jeovanio-Silva AL, Brasil PE, Costa MJ, Rolla VC.** The roles of GSTM1 and GSTT1 null genotypes and other predictors in anti-tuberculosis drug-induced liver injury. *J Clin Pharm Ther.* 2012, 37 :712–718.

N

- **Nadir S, Benkhaldoun L, Haddad F.** Les atteintes hépatiques médicamenteuses : diagnostic et conduite pratique. 2004, 11 (105) : 251-258
- **Nathan C.** Taming tuberculosis: a challenge for science and society. *Cell Host Microbe*. 2009,5(3):220-4.
- **Nimse SB, Pal D.** Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.*, 2015, 5, 27986-28006.
- **Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C.** Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol*. 2008, 153:6–20.
- **Nagaraju GP, Aliya S, Zafar SF, Basha R, Diaz R, El-Rayes BF.** The impact of curcumin on breast cancer. *Integr Biol (Camb)*. 2012, 4(9):996-1007.

O

- **Ono Y, Wu X, Noda A, Noda H, Yoshitani T.** Participation of P450-dependent oxidation of isoniazid in isonicotinic acid formation in rat liver. *Biol Pharm Bull*. 1998,21(4):421-5.
- **Oyaizu, M.** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan J Nutr*. 1986, 44: 307-315.
- **Ozenda P.** Flore du Sahara Septentrional et Central, Centre National de la Recherche Scientifique, Imprimerie Louis-Jean. H.A. 1958, pp 432.

- **OMS.** Journée mondiale de lutte contre la tuberculose. **2016**, [http://www.who.int/campaigns/tb-day/2016/fr\(mise à jour avril 2016\)](http://www.who.int/campaigns/tb-day/2016/fr(mise%20%C3%A0%20jour%20avril%202016)).

P

- **Pal, R, Rana SD, Vaiphei K, Singh K.** Isoniazid-rifampicin induced lipid changes in rats. *Clin. Chim. Acta.* 2008,389 (1-2): 55-60.
-
- **Pandey KB , Rizvi SI .**Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009, 2(5): 270–278.
- **Pengcheng W, Komal P, Xiao-bo Z, Xiaochao M.** Isoniazid metabolism and hepatotoxicity. *Acta Pharm Sin.* 2016, 6(5): 384–392.
- **Pessayre D, Haouzi D, Fau D, Robin MA, Mansouri A, Berson A.** Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes : different forms of drug-induced hepatic apoptosis.*J Hepatol*, 1999, 31 : 760-70.
- **Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C.** Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Pharm.*2015, 54-62.
- **Piriou, A., J.M. Warnet, and A. Jacqueson, J.R. Claude, R. Jruhaut.** Fatty liver induced by high doses of rifampicin in the rat: possible relation with an inhibition of RNA polymerases in eukariotic cells. *Arch Toxicol Suppl.* 1979, (2):333-7.
- **Preziosi P.** Isoniazid: metabolic aspects and toxicological correlates. *Curr Drug Metab.* 2007, 8(8):839-51.
- **Prieto PM. PinedaM, Aguilar H.** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex:specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.* 1999, 269: 337-341.
- **Porter, N. A., Caldwell , S. E.** Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids." *Lipids.* 1995, 30 (4): 277-90.

- **Pandey KB , Rizvi SI.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009, 2(5): 270–278
- **Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M.** Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2017,38(7):592-607.

Q/R

- **Qader G, Roshna S, Zheen A, ZanaFaeq A, Saad A.** "protective effects of quercetin against isoniazid and rifampicin induced hepatotoxicity in rats." *Amer J Pharm Sci.*2014, 3 :56-60.
- **Rabinowich L, Shibolet O.** Drug Induced Steatohepatitis. *Biomed Res Int.* 2015: 168-172
- **Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.N., 2006.** Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J Control Release*,2006, 113:189–207.
- **Ravikumar, V., K., S., Shivashangari, and T. Devaki.** Hepatoprotective activity of *Tridax procumbens* against d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatitis in rats. *J. Ethnopharmacol.* 2015,101(3): 55-60.
- **Reddy, JM, Rao MS. 2016.** Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Liver Physiol.* 290: 2016, 852–858.
- **Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM. Pridham JB.** The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic.Res.* 1995,22: 375-383.

-
- **Rios-Santos F and Magno LA(2012).** Pharmacogenetics and Metabolism: Past, Present and Future, Topics on Drug Metabolism, Dr. James Paxton (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/28154.
 - **Robinson, VK, Sato, E, Nelson, DK, Camhi, SL, Robbins, RA, Hoyt, JC,** Peroxynitrite inhibits inducible (type 2) nitric oxide synthase in murine lung epithelial cells in vitro. *Free Radic Biol Med.* 2001, 30: 986–991.
 - **Rotruck J.T, Pope A.L, Ganther H.E, Swason A.B,** Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science* 179 (1973) 588-590
 - **Ramanathan R, Sivanesan K.** Evaluation of ameliorative ability of Silibinin against zidovudine and isoniazid-induced hepatotoxicity and hyperlipidaemia in rats: Role of Silibinin in Phase I and II drug metabolism. *Chem Biol Interact.* 2017, 273:142-153.
 - **Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG.** Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973 Feb 9;179(4073):588-90.

S

- **Sahnoun Z, Jamoussi K, Zeghal KM.** Free radicals and antioxidants (Part1). *Therapie.* 1997, 52(4):251-257.
- **Sahnoun Z, Jamoussi K, Zeghal KM.** Free radicals and antioxidants (Part2). *Therapie.* 1998, 61(2):126-139.
- **Saiga I, Muhammad S, Nawal M.** Amelioration of isoniazid and rifampicin-induced liver toxicity by *Amaranthus graecizans subsp. silvestris* in rat. *Bangladesh J Pharm.* 2017, 12(3):23-31.
- **Salas-Salvadó J, Casas-Agustench P, Murphy MM, López-Uriarte P, Bulló M.** The effect of nuts on inflammation. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008,17:333-339.

-
- **Santhosh S, Sini TK, Anandan R, Mathee PT.** Hepatoprotective activity of chitosan against isoniazid and rifampicin-induced toxicity in experimental rats. *Eur J Pharmacol*, 2007; 572: 69-73.
 - **Santhosh S, Sini TK, Anandan R, Mathew PT.** Hepatoprotective activity of chitosan against isoniazid and rifampicin-induced toxicity in experimental rats. *Eur J Pharmacol*, 2017;5 : 69-73
 - **Sarich TC, Adams SP, Petricca G, Wright JM .** Inhibition of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits by pretreatment with an amidase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015, 289(2):695-702.
 - **Sarich, T.C., S.P. Adams, T. Zhou, and J.M. Wright. 1997.** Isoniazid-induced hepatic necrosis and steatosis in rabbits: absence of effect of gender. *Rev canad physio pharm.*1997, 75(9): 1108-11.
 - **Sarkar S, Ganguly A, Sunwoo HH.** Current Overview of Anti-Tuberculosis Drugs: Metabolism and Toxicities. *Mycobact Dis.* 2016, 6:209.
 - **Scalbert A, Manach C, Morand C, and Remesy C.** Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Food Scien. Nutri.*2005, 45:287–306
 - **Scibior D, Czczot H.**Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw .* 2006;60:170-80
 - **Seyed MK ; Taghi M; Hayati N ; Yaghmaei P** · The Effects of *Cinnamomum zeylanicum* on Up-Regulation of LDL Receptor Gene Expression in Hamsters Fed a High Cholesterol Diet. *J Natural Pharm Prod.*2016, e37340 .
 - **Shacter E.** Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 2000,32:307–326.

-
- **Shanker G, Syversen T, Aschner JL, Aschner M.** Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury- induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005, 137: 11-22
 - **Shen, C, Li D, Meng, Q.** Investigation of rifampicin-induced hepatotoxicity in rat hepatocytes maintained in gel entrapment culture. *Cell Biol Toxicol.* 2009, 25, 265–274.
 - **Shklar G.** Mechanisms of cancer inhibition by anti-oxidant nutrients. *Oral Oncol* 1998, 34:24–9.
 - **Singh H, Jindal S, Singh M, Sharma G, Kaur IP.** Nano-formulation of rifampicin with enhanced bioavailability: development, characterization and in-vivo safety. *Int J Pharm.* 2015,5(2):138-51.
 - **Singla N, Gupta D, Birbian N, Singh J.** Association of NAT2, GST and CYP2E1 polymorphisms and anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Tuberculosis.* 2014, 94(3):293-8.
 - **Sodhi CP, Rana SV, Mehta SK, Vaiphei K, Attari S.** Study of oxidative-stress in isoniazid-rifampicin iduced hepatic injury in young Rats. *J Drug Chem Toxi.* 1997, 20 (3):34-41.
 - **Somoskovi, A., Parsons, L.M., Salfinger, M., 2001.** The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Resp. Res.*2001, 2, 164–168.
 - **Sreejayan, Rao MN.** Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 105-107.
 - **Sun TH; Morgenstern R.** Binding of glutathione and an inhibitor to microsomal glutathione transferase. *Biochem J.* 1997, 326(1): 193–196.

T

- **Tafazoli S, Mashregi M, O'Brien PJ.** Role of hydrazine in isoniazid-induced hepatotoxicity in a hepatocyte inflammation model. . *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 ; 229(1):94-101
- **Tang N., Deng R., Wang Y., Lin M., Li H., Qiu Y.** GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013,17 :17–25.
- **Tarantino G, Di Minno MN, Capone D.** Drug-induced liver injury. *World J Gastroenterol* 2009,15:2817-33.
- **Tasduq SA, Peerzada K, Koul S, Bhat R, Johri RK.** Biochemical manifestations of anti-tuberculosis drugs induced hepatotoxicity and the effect of silymarin. *Hepatol. Res.* 2005, 31: 132–135.
- **TeixeiraRLF, LopesMQ, SuffysPN,Santos AR.(2013).** Tuberculosis Pharmacogenetics: State of The Art. LicenseeInTech, USA: 107-125.
- **Teschke R, Danan G.** Molecular research on drug induced liver injury. *Int. J Mol Sci.* 2018, 19(1): 216-221
- **Thee S, Seddon JA, Donald PR, . Seifart HI, Werely CJ, Hesselring AC.** Pharmacokinetics of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in children younger than Two years of age with tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(12) : 60-67.
- **Thonda, V.S.S.S., and K.P. S. Gowda. 2012.** Hepatotoxicity Mechanisms and itsBiomarkers. *Inter J Pharm Chem Sci.* 2012,1 (2):675-682.

-
- **Ting L, Xiao H Y, En ZG, Xiao NL ,Li JS, Hua LL.** Hepatoprotective Effect of Active Constituents Isolated from Mung Beans (*Phaseolus radiatus* L.) in an Alcohol-Induced Liver Injury Mouse Model. *J Food Biochem.*2014, 38(5) : 453–459.
 - **Tsao R.** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2010,2:1231-1246.

V/W/ Y

- **Vinken M, Maes M, Oliveira AG.** Primary hepatocytes and their cultures in liver apoptosis research. *Arch Toxicol.* 2014, 88:199–212.
- **Vinken M, Maes M, Vanhaecke T.** Drug-induced liver injury: mechanisms, types and biomarkers. *Curr Med Chem.* 2013, 20:3011–3021.
- **Weber, L.W., Boll, M., Stampfl, A.** Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.*2017, 33, 105–136.
- **Wilkins JJ, Langdon G, McIlleron H, Pillai G, Smith PJ, Simonsson US.** 2011. Variability in the population pharmacokinetics of isoniazid in South African tuberculosis patients. *Br J Clin Pharmacol.* 72:51–62.
- **Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW.** The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med.* **1975**,85(2):337-41.
- **Yew W, Leung CC.** Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. *Respirology.* 2006,11: 699-707.
- **Yew, W.W., and C.C. Leung., 2006.** Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. *Respirology.* 2006,11(6):699-707.

-
- **Yamamoto T, Kikkawa R, Yamada H, Horii I.** Identification of oxidative stress-related proteins for predictive screening of hepatotoxicity using a proteomic approach. *JToxicol Sci.*,2005, 30(3): 213-227.
 - **Yamori S, Ichiyama S, Shimokata K, Tsukamura M.** Bacteriostatic and bactericidal activity of antituberculosis drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Immunol.* 1992,36(4):361-368.

Z

- **Zeruesenay Desta, Nadia V. Soukhova, David A. Flockhart.** Antimicr Agents Chemother. 2001, 45(2): 382–392.
- **Zhai Q, Lu SR, Lin Y, Yang QL, Yu B.** Oxidative stress potentiated by diallylsulfide, a selective CYP2E1 inhibitor, in isoniazid toxic effect on rat primary hepatocytes. *Toxicol Lett.* 2008 ,183(1-3):95-8.
- **Zhang RL, Wang ZY, Li D, Cheng WB.** Effect of rifampicin on pharmacokinetics of isoniazid and its metabolite acetylhydrazine in rats. *Acta Pharm Sinica.* 1992, 13(6): 494-496.
-
- **Zhang ZH, Tang JH, Zhan ZL, Zhang XL, Wu HH, Hou YN.** Cellular toxicity of isoniazid together with rifampicin and the metabolites of isoniazid on QSG-7701 hepatocytes. *Asian Pac J Trop Med.* 2016,5(4):306-309
- **Zhang PY.** Polyphenols in Health and Disease. *Cell Biochem Biophys.* 2015,73(3):649-664.

Titre : L'effet de la plante *Lifago dielsii* sur le stress oxydatif/ nitrosatif et apoptotique hépatocytaire induit par les antituberculeux.

Résumé :

Le but de la présente étude est d'évaluer *in vivo* l'effet antioxydant et hépatoprotecteur de l'extrait butanolique de *Lifago dielsii* (BELD). Les rats mâles adultes *Wistar Albinos* ont été gavés par l' BELD (250 mg / kg) durant une période de 14 jours et simultanément reçoivent un traitement combiné de l'isoniazide (INH, 75mg/kg) et de la rifampicine (RIF, 150mg/kg). Une étude *in vitro* de l'activité antioxydante de l'EBLD a été également effectuée. Le traitement combiné de l'INH/RIF induit un dysfonctionnement hépatique qui s'est révélée par ; une augmentation significative du taux des enzymes sériques (ALT, AST, ALP, LDH), perturbation des paramètres de profile lipidique (HDL, LDL, cholestérol et TG hépatique/sérique) et ceux du stress nitroso-oxydatif hépatique (MDA, 4HNE, LHP, nitrosothiols, protéines carbonylées, monoxyde d'azote) par rapport aux témoins. De même, le traitement par INH/RIF a provoqué une réduction significative de l'activité antioxydante de la SOD, CAT, GST, GPx et POD et le taux de GSH au niveau du foie. Histologiquement, la combinaison de l'INH/RIF était capable d'induire une stéatose hépatique sévère. Contrairement, le prétraitement des rats avec l' BELD protège le foie contre les attaques des métabolites toxiques générés par l'INH/RIF, permettant ainsi le maintien des fonctions hépatiques et l'équilibration du statut redox hépatique. Il s'avère, de cette étude *in vivo*, que l' BELD est doté d'une activité antioxydante et hepatoprotectrice avec une action positive sur la restauration de la stéatose induit par l'INH/RIF. L'effet antioxydant de l'EBLD il a été étudiée au niveau *in vitro* par la réalisation des tests tels que : pouvoir réducteur, piégeage du radical hydroxyle (HO°), capacité antioxydant totale, effet chélateur du fer, effet anti – oxyde nitrite (NO°) et Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique. Les résultats obtenus montre que cet extrait possède une forte activité scavenger de radical HO° et de NO° , ainsi que une forte capacité réductrice et inhibitrice de la peroxydation lipidique. En conclusion, l'étude réaliser valide l'innocuité et l'efficacité de la plante *lifago dielsii* qui est une plante issue de la médecine traditionnelle Algérienne. L'ensemble des résultats obtenue soutiennent aussi le potentiel thérapeutique de l'extrait butanolique de cette plante, fournit ainsi la preuve que ses extraits et composés bioactifs peuvent être développés comme un nouveau produit naturel pour la prévention des atteintes hépatique.

Mots clés : Isoniazide, Rifampicine, *Lifago dielsii.*, stress oxydatif et nitrosatif, Hépatoprotection.