

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique
Université de Jijel
Faculté des Sciences
Département de Biochimie-Microbiologie



BC. 01 106

Mémoire
de Fin d'Etude

01
/08

En Vue de L'obtention du Diplôme Des
Etudes Supérieures en Biologie
Cellulaire et Moléculaire
Option : Biochimie



Thème

Variation de l'activité de la SOD, Catalase et Glutathion
Au cours du traitement par les anticancéreux
(Hépatotoxicité)

Présenté Devant le Jury

Président : Mr. ALIANE M.
Examineur : Dr. LAHOUEL M.
Encadreur : M^{lle} BENGUEDOUAR L.
Promotion 2005-2006

Présenté par :

-BELLAGHMA H.
-BOURAFROUF M^{ed}.
-KHIREDDINE A.





REMERCIEMENT

Nous tenons à remercier en premier lieu DIEU, de nous avoir donné la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous remercions notre honorable encadreur, M^{lle} Benguedouar, pour sa précieuse aide, ses conseils et sa totale disponibilité.

Nos vifs remerciements s'adressent à tous les enseignants qui ont participé de près ou de loin à notre formation, ainsi qu'au personnel, du laboratoire de l'insitut de biologie et de la bibléothèque de la faculté des sciences.

Nous remercions également Mr Aliane Mohammed d'avoir acépté de présider le jury et juger notre travail ainsi que

Dr Lahouel Mesbah d'avoir accepté de l'examiner aussi.

Enfin nous remercions tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

Introduction	1
---------------------------	---

Partie bibliographique

Chapitre I -Aspect Anatomique et Physiologique du Foie	3
I-1- Le Foie	3
I-2- Anatomie du Foie	3
I-3-Histologie du Foie	4
I-4- Physiologie du Foie	5
I-4-1- Fonctions Métaboliques.....	6
I-4- 2- Fonctions Biliaires	7
I-4-3- Fonctions de Détoxication.....	7
Chapitre II- HÉPATOTOXICITÉ	11
II- II-1- Toxicité Médicamenteuse	11
II-1-1- Toxicité par les médicaments anticancéreux	11
II-1-2- Mode d'action des anticancéreux :	12
II-1-3- Classification	12
II-1-4-La chimiothérapie.....	15
II-1-5- La polychimiothérapie anticancéreuse.....	15
II-1-6- Exemple des anticancéreux	15
-a- L'épirubicine	15
-b- Méthotrexate	18
II-2 Mécanisme d'Action des Toxiques au Niveau du Foie	19
II-3- Principales Lésions Hépatiques	20
Chapitre III- STRESS OXYDATIF	22
III-1-Introduction et définition	22
III-2- Radicaux libres	22
III-2-1- Définition	22
III-2-2-Différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène	22

III-2-3- Sources des radicaux libres.....	23
III-2-4-L'Origine cellulaire des ROS	24
III-3-Système de défense antioxydants	25
III-3-1- Superoxyde dismutase (SOD)	25
III-3-2- La catalase	26
III-3-3- Les Glutathion peroxydases	26

Chapitre IV- EXPLORATION FONCTIONNELLE DU FOIE ...28

IV -1-Paramètres Biochimiques Sériques Marqueurs de la Fonction Hépatique.....	28
IV-1-1- Les Transaminases	28
IV-2- Les Enzymes Cytosoliques Hépatiques.....	29
IV-2-1- Superoxyde Dismutase (SOD).....	29
IV-2-2- Catalase.....	29
IV-2-3-Glutathion peroxydase	30

Partie pratique

Chapitre I- Matériel et Méthodes.....31

I-1-Matériel	31
I-1-1-Matériel Biologique	31
I-1-2- Matériel Chimique	31
I-1-3- Matériel de laboratoire.....	32
I-2- Méthodes.....	33
I-2-1- Les prélèvements sanguins.....	33
I-2-2- Le pélévement du foie.....	34
I-2-3 Exploration biochimique.....	34
a- Extraction de la fraction cytosolique.....	34
b- Dosage des Protéines Cytosoliques.....	35
c- Activité de la catalase	36
d- L ' activité de la SOD	37
e- - Dosage du glutathion cytosolique.....	38
f - Mesure de l ' activité de la TGP.....	39
g- Mesure de l ' activité de la TGO.....	40

Chapitre II- RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....	42
Introduction.....	42
II-1- Surveillances Pondérales et Alimentaire des Animaux.....	43
II-2- Résultats du Dosage Protéique et les Mesures des Activités des Enzymes Cytosoliques.....	46
II-2-1 Dosage des Protéines Cytosoliques.....	46
II-2-2- Mesure de l ' Activité de la Catalase.....	47
II-2-3- Mesure de l ' Activité de la SOD.....	48
II-2-4- Mesure de l ' Activité du Glutathion.....	48
II-3- Résultats des Activités Enzymatiques Sanguines	50
II-3-1- Activité de la TGP	51
II-3-2- Résultats de l'Activité de la TGO.....	52
 Chapitre III-DISCUSSION.....	 53
 Conclusion.....	 57

Liste des tableaux

Tableau N°

page

Partie bibliographique

Tableau I : Modes d'Action des Médicaments Anticancéreux.....	13
Tableau II : Principales Lésions Hépatiques.....	21
Tableau III : Catégories des SOD et leur localisation.....	29

Partie pratique

Tableau I : Poids des foies et poids corporels des rats sacrifiés	33
Tableau II : composition du mélange réactionnel.....	35
Tableau III : dosage des protéines cytosoliques	35
Tableau IV : réactifs utilisé pour la mesure de l'activité de la catalase.....	36
Tableau V : mesure de l'activité de la catalase.....	36
Tableau VI : composition de réactif de travail	37
Tableau VII : mesure de l'activité de la SOD.	38
Tableau VIII : composition de réactif de travail	38
Tableau IX : dosage du glutathion cytosolique.....	39
Tableau X : réactifs utilisé pour la mesure de l'activité de la TGP :.....	39
Tableau XI : mesure de l'activité de la TGP	40
Tableau XII : réactifs utilisé pour la mesure de l'activité de la TGO	41
Tableau XIII : mesure de l'activité de la TGO	41

Tableau XV : Poids des foies et poids corporels des rats sacrifiés.....	42
Tableau XVI : Moyennes des Pesées Quotidiennes des Animaux	44
Tableau XVII : Quantités (g) d ' aliment consommé dans chaque lot	45
Tableau XVIII : Résultats du Dosage des Protéines Cytosoliques.(mg/ml).....	46
Tableau XIX : Résultats de l'activité de la catalase (UI).....	47
Tableau XX : Résultats de l'activité de la SOD	48
Tableau XXI : Résultats de DO de la courbe d'étalonnage de la GSH	49
Tableau XXII : Résultats du dosage(μ M)de la glutathion cytosolique.....	50
Tableau XXIII : Résultats de le Mesure de l'activité du TGP (u/l).....	51
Tableau XXIV : Résultats de le Mesure de l'activité du TGO.....	52

Liste des figures

Figure N°

page

Partie bibliographique

Figure 1: Le Foie.....	4
Figure 2 : Aspect Tridimensionnel du Lobule Hépatique.....	5
Figure 3 : Fonctions Métaboliques du Foie	7
Figure 4 : La Structure de l'épirubicine	16
Figure 5 : La Structure du méthotrexate	18
Figure 6 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie	24
Figure 7 :Mécanisme dedétoxication enzymatique (SOD-Catalase et Glutathion).....	27
Figure 8 : Mode d'Action des Principaux Systèmes Enzymatiques Antioxydants et de leurs Cofacteurs Métalliques	27
Figure 9 : Réaction chimique catalysée par la TGO.....	28
Figure 10 : Réaction chimique catalysée par la TGP.....	29

Partie pratique

Figure 1 : prélèvement du sang à partir de la veine retro-orbitale.	33
Figure 2 : Dissection du rat et prélèvement du foie	34
Figure 3 : Comparaison des rapports poids du foie/poids corporel chez les rats témoins et traités	43

Figure 4 : Evolution des poids des rats au cours des semaines de l'étude.....	44
Figure 5. Evolution de la quantité d ' aliment consommé par les rats témoins et traités au cours du temps	45
Figure 6: Variations de la concentration des protéines cytosolique chez les animaux témoins et traités.	46
Figure 7 : Variations de l ' Activité de la Catalase dans le cytosol Hépatique entre témoins et traités	47
Figure 8 : Variations de l ' activité de la SOD entre les rats témoins et traités.....	48
Figure 9 : Courbe d ' étalonnage de la GSH	49
Figure 10 : Variations de la GSH entre témoins et traités	50
Figure 11: Variations de l ' Activité de la TGP entre Témoins et Traités.....	51
Figure 12: Variations de l'activité de la TGO entre témoins et traités	52

GLOSSAIRE

- Anabolisant** : terme désignant l'action favorisant la construction musculaire sous une impulsion soit d'ordre chimique (dopant) mais aussi alimentaire (protéine).
- Ampoule de Vater**: Portion de la paroi duodénale où s'abouchent le canal cholédoque (canal biliaire principal, véhicule de la bile) et le canal de Wirsung (canal pancréatique, véhicule du suc pancréatique).
- Canal cystique** : canal qui fait communiquer la vésicule biliaire avec le canal hépatocholédoque.
- Canal cholédoque**: le canal hépatique forme le canal cholédoque qui conduit au duodénum de l'intestin grêle.
- Cellules du kupffer**: type cellulaire qui construit les sinusoides, activité phagocytaire (SRE).
- Cholécystokinine** : régurgitation de liquide acide et chaud dans la bouche (définition restrictive du pyrosis). ...
- Hépatomégalie** : augmentation de volume du foie
- Hépatopathie** : maladie du foie
- Ischémie** : Terme physiopathologique désignant l'arrêt de l'apport sanguin artériel dans un territoire donné de l'organisme. . .
- Mécanisme immuno-allergique** : ensemble des processus permettant la production continue et régulée des cellules sanguines.
- Sinusoïdes**: espace irrégulier, remplis de sang entre les travées d'hépatocytes connectent veine porte-veine centrolobulaire
- Sphincter d'Oddi**: Système sphinctérien que présente la partie terminale du cholédoque au niveau de son abouchement dans le duodénum.
- Veine cave inférieure**: La veine cave inférieure est d'un calibre plus gros que la veine cave supérieure. Elle draine le sang veineux de la moitié inférieure du corps et le conduit dans l'oreillette droite du cœur.

-Xénobiotique : désigne ce qui est étranger à la vie (substance, molécule, étrangères à la biosphère), molécules chimiques de synthèse étrangères à l'organisme et résistantes à la biodégradation ou substance possédant des propriétés toxiques même à faible concentration (ex : pesticides).

Abriviation

- **ADN** :Acide Désoxyribo Nucléotide
- **ALT** :Alanine-aminotransférase
- **ARN** :Acide Ribo-Nucléotide
- **AST** :Aspartate-aminotransférase
- **ATP** :Adénosine triphosphate
- **DO** :densité optique
- **DTNB** :dinitrobutetrazolium
- **EDTA** :Ethylene Diamine Tetra Aetic
- **EPI** :Epirubicine
- **GSH** :Glutathion
- **GSH-Px** :Glutathion peroxidase
- **GSSH** :Glutation disulfure
- **H₂O₂** :Peroxyde d'hydrogène (Eau oxygéné)
- **LDH** :Lactate déshydrogénase
- **MDH** :Maltate déshydrogénase
- **MTX** :Méthotrexate
- **NAD⁺** :Nicotinamide Adénine Dinucléotide
- **NADP** :Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Oxydée
- **NADPH** :Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Réduit
- **NBT** :Nitroblue Tetrazolium
- **O₂⁻** :Anion Superoxyde
- **ROS** :Reactive Oxygen Sepecies
- **Rpm** :Tour par minute
- **SOD** :Superoxyde dismutase
- **TCA** :Tri chloroacétate
- **TGO** :Transaminase glutamique oxaloacétique
- **TGP** :Transaminase glutamique pyruvique
- **ΔA** :l' accroissement moyen d'absorbance
- **μM** :micromole



INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cancer est un ensemble de maladies malignes concernant la prolifération cellulaire. Il existe un certain nombre de facteurs favorisant le développement d'un cancer, parmi eux : les facteurs biologiques (hérédité, virus, déficiences du système immunitaire). Les facteurs physiques (rayonnement ionisants) et les facteurs chimiques. Le cancer serait donc multifactoriel, et les différents facteurs pouvant interagir d'une façon simultanée ou séquentielle, pour déclencher la formation de tumeurs malignes (Tamborirai, 1997).

Les traitements traditionnels du cancer incluent la chirurgie d'exérèse (CHX) la radiothérapie (RT) et la chimiothérapie (CT). Les deux premières ont une action purement locale, la troisième à une action systémique, les caractéristiques des tumeurs sont prises en compte pour la mise au point de nouveaux médicaments (Deuler, 1998).

Les médicaments anticancéreux ont pour but de détruire les cellules tumorales et le premier critère de leur efficacité est la réduction de la tumeur (Becauorn, 1993).

• Des études précédentes ont montrés que la toxicité hépatique induite par les anticancéreux est associée à un stress oxydatif caractérisé par une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène et des produits dérivant de lipides membranaires endommagés tels que les substances réactives de l'acide thiobarbiturique et les dérivées conjuguées (Berthoin, 2000)

- Le stress oxydant était impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies y compris le cancer (Pincemail *et al.*, 1998). Certaines drogues anticancéreuses (bléomycine, cisplatine, Adryamycine, Mitomycine,...) ont pour effet d'augmenter considérablement la production de radicaux libres oxygénés, ces composés extrêmement réactifs s'attaquent alors aux acides nucléiques (ADN, ARN), aux lipides, aux protéines et provoquent la mort cellulaire (Velez De La Calle *et al.*, 1992).

La présente investigation vise à évaluer l'activité du système enzymatique de détoxification par l'exploration des activités enzymatiques cytosoliques de la Superoxyde Dismutase, la Catalase et le dosage du Glutathion. A cela s'ajoute la mesure des activités enzymatiques sériques de la TGO et TGP principaux marqueurs de la fonction hépatique. En vue de mettre en évidence l'apparition d'une éventuelle hépatotoxicité secondaire à un traitement anticancéreux chez des rats Albinos *wsitar*.

chapitre I

Aspect Anatomique et Physiologique du Foie

- *Le Foie*
- *Anatomie du Foie*
- *Histologie du Foie*
- *Physiologie du Foie*

I- Aspect Anatomique et Physiologique du Foie :

I-1- Le Foie :

Le foie est le plus gros organe interne chez les vertébrés présentant environ 1,5 kg chez l'homme de 10 à 15g chez le rat (Encyclopédie, 1998), du point de vue métabolique, le foie est considéré comme étant l'organe le plus complexe ; Il est impliqué dans le métabolisme alimentaire, de la plupart des médicaments et des toxiques ; Ces derniers sont généralement détoxifiés, mais certains sont bio activés et deviennent plus toxiques (Lu, 1991).

I-2- Anatomie du Foie :

Le foie se situe sous le diaphragme et s'étend d'avantage du côté droit du plan médian de l'organisme que du gauche. Il se trouve presque entièrement dans la cage thoracique (Elaine, 1998).

Le sang provenant du foie est recueilli par les veines hépatiques qui confluent en une seule veine se vidant vers la veine cave inférieure, puis il retourne au cœur droit pour être acheminé vers les poumons. Le tissu hépatique est constitué d'unités microscopiques appelées lobules, séparées par du tissu conjonctif. Ces lobules sont constitués de cellules entourées de minces canaux, les canalicules biliaires, dans lesquels se déverse la bile sécrétée par les cellules hépatiques. Ces canalicules se rejoignent pour former progressivement des canaux plus importants, puis le canal hépatique. Le canal hépatique et le canal cystique drainant la vésicule biliaire forment le canal cholédoque, qui se décharge dans le duodénum. Chez les primates et les carnivores, le canal pancréatique rejoint généralement le canal cholédoque avant de se déverser dans l'intestin (Encarta, 2006).

Le foie se divise en quatre lobes : le plus grand étant le lobe droit, il est visible sur toutes les faces du foie ; Il est séparé du lobe gauche ; plus petit, par un sillon profond. Le lobe caudé, postérieur et le lobe carré situé sous le lobe gauche, sont visibles lorsque le foie est observé par le dessous (fig.1) (Elaine, 1993).

La vésicule biliaire est située dans une fossette sur la face inférieure du lobe droit du foie (Elaine, 1993).

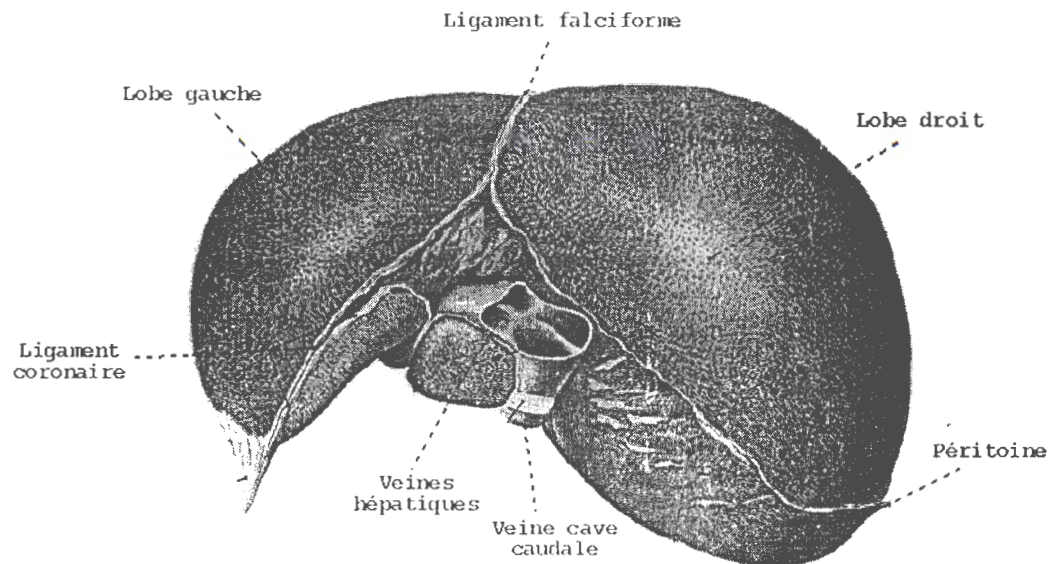


Figure 1 : Le Foie (Cotin, 1998)

Le foie est vascularisé : il contient environ 900g de sang et reçoit :

- * Un vaisseau veineux, la veine porte, qui draine le sang issu du tube digestif ;
- * Une artère nourricière, et artère hépatique, le sang du foie est conduit à la veine cave inférieure par les veines sur-hépatiques (Domart, 1989).

I-3-Histologie du Foie :

Le foie est formé d'unités structurales et fonctionnelles de la grosseur de grains de sésame, appelés lobules hépatiques (fig.2) chaque lobule possède une hexagonale, à peu près cylindrique constituée de travées de cellules épithéliales appelées hépatocytes, ou cellules hépatiques. Les travées d'hépatocytes rayonnent vers l'extérieur à partir d'une veine centro-lobulaire dirigée vers le haut, dans l'axe longitudinal du lobule (Elaine, 1993).

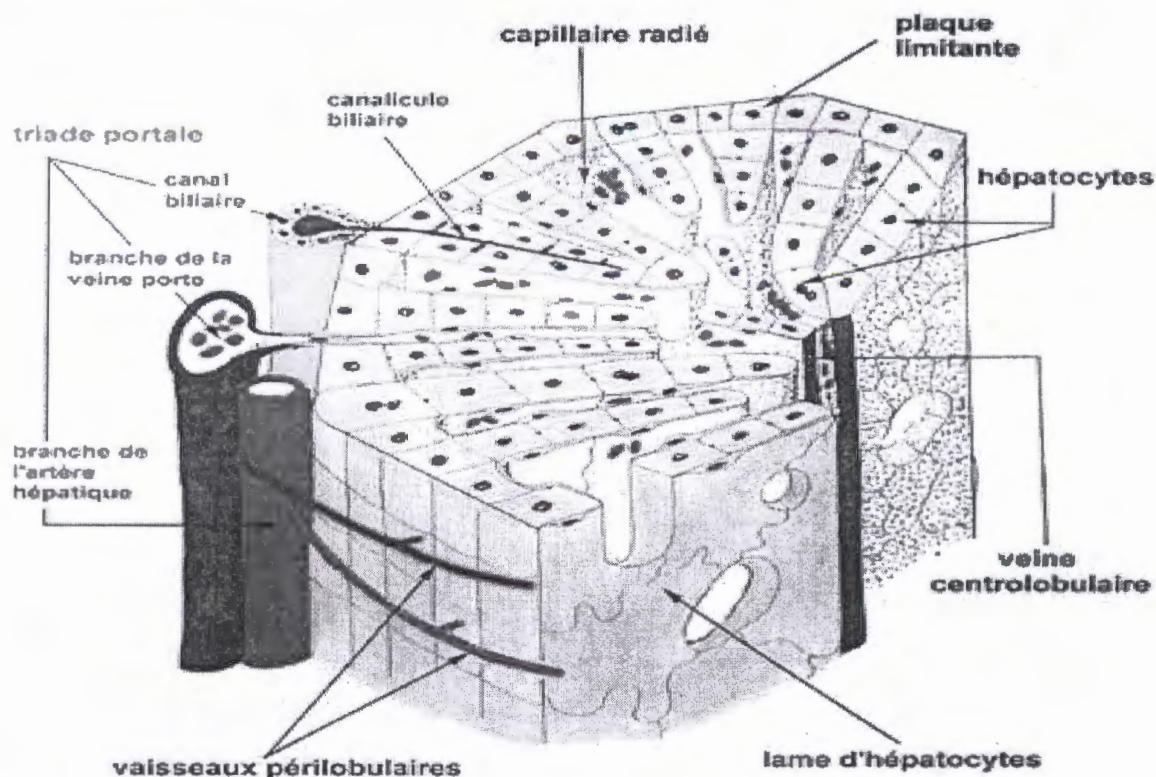


Figure 2 : Aspect Tridimensionnel du Lobule Hépatique
(Thésaurus Médical Informatique)

Les sinusoides, des capillaires sanguins discontinus, circulent entre les travées d'hépatocytes, (Elaine, 1993).

La glande hépatique comporte au moins six types cellulaires qui coopèrent : les hépatocytes, les cellules de kupffer, les lipocytes et les pitscells (Lu, 1992)

Les cellules du foie ou hépatocytes sont spécialisés dans la gestion des substances de base que l'organisme requiert, les protéines, les hydrates de carbone et les graisses (Coscendish, 1995).

Ils sont très riches en organites cellulaires : mitochondries, lysosomes, réticulum endoplasmique, plages glycogéniques, certains de leurs faces sont accotés aux parois endothéliales des sinusoides par l'intermédiaire d'un étroit interstice (espace de Disse) les autres faces sont accotés aux hépatocytes adjacents (Domart, 1989)

I-4- Physiologie du Foie :

Les fonction du foie sont diverses, multiples et vitales, elles peuvent se résumer-en :

- fonctions métaboliques
- fonctions biliaires
- fonctions de détoxication

I-4-1- Fonctions Métaboliques :

Le foie participe à presque tous les métabolismes, et sa destruction complète est incompatible avec la vie (fig.3) (Domart, 1989).

Le foie à un quadruple rôle :

- Rôle régulateur pour l'ensemble de l'organisme, sa constitution varie donc en fonction de l'alimentation.
- Organe de synthèse de différents constituants destinés aux autres organes.
- Organe à métabolisme endogène très riche.
- Formation de l'urée qui permet l'élimination de l'azote (Kruh, 1993).

Le foie est l'un des rares organes à se régénérer rapidement et facilement après une lésion ou l'ablation d'une de ses parties (Elaine, 1998). Il joue un rôle fondamental dans le métabolisme des glucides. Il peut produire le glucose à partir des lipides et des protides (néoglucogenèse). Il peut produire du glucose par transformation d'autres oses (par exemple : galactose) (Domart, 1989).

Après un repas riche en glucides, des milliers de molécules de glucose sont retirées du sang et assemblées en de grosses molécules, le polysaccharide ainsi formé, le glycogène, est ensuite emmagasiné dans le foie, ce processus est appelé glycogenèse (Elaine, 1998).

Le foie intervient dans le métabolisme des protides. Il synthétise le sérum albumine, certains alpha- et bêta- globulines, le fibrinogène, les facteurs de coagulation du groupe prothrombine. Il assure une bonne partie du catabolisme des acides aminés par désamination oxydative et transamination (Domart, 1989).

Le foie intervient dans le métabolisme des lipides, Il capte les chylomicrons et les acides gras libres du sang et il peut les cataboliser (Domart, 1989).

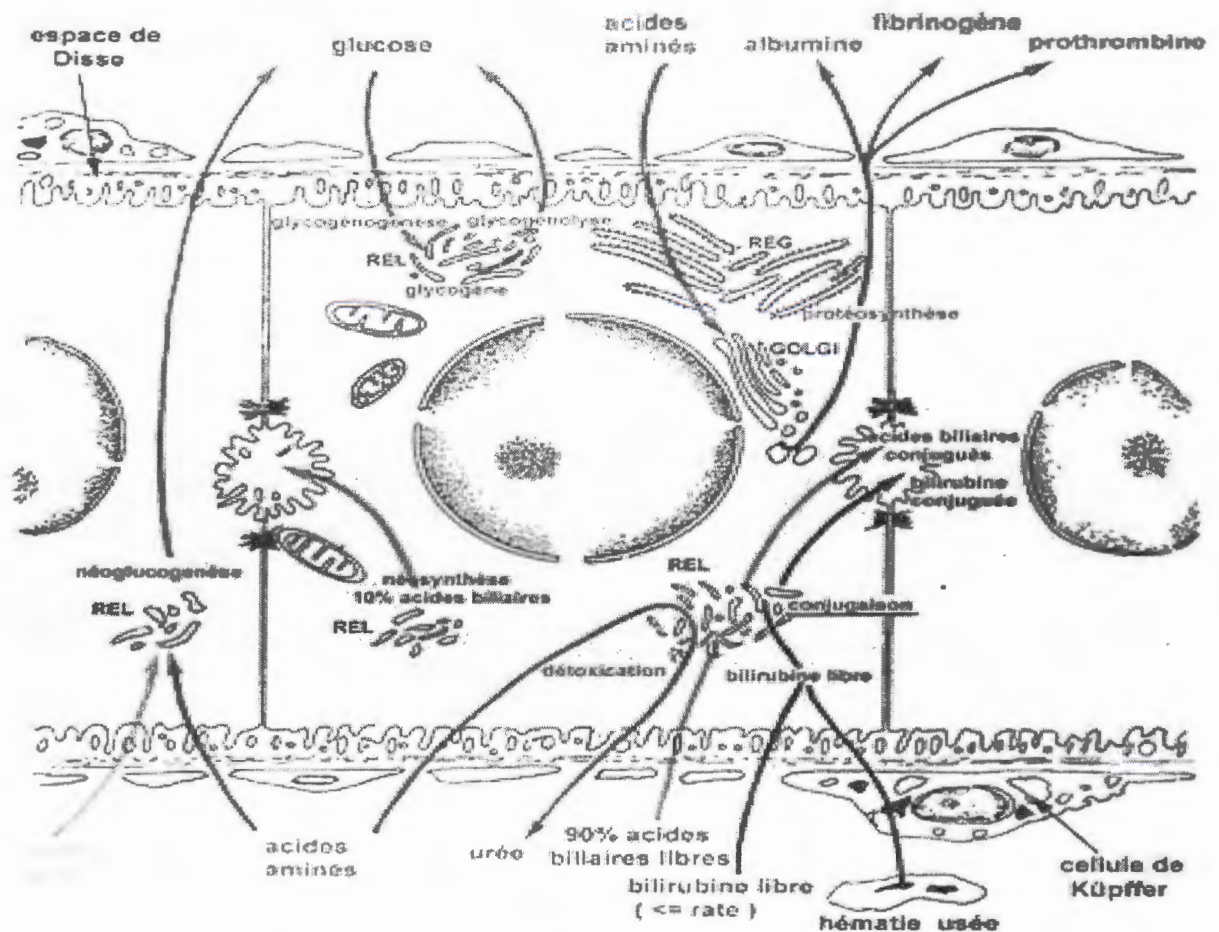


Figure 3 : Fonctions Métaboliques du Foie (Langlois, 1998).

I-4-2- Fonctions Biliaires :

La fonction biliaire conditionne l'absorption intestinale des lipides, assure l'homéostasie du cholestérol et l'élimination de différents produits de dégradation, comme ceux de l'hémoglobine, sous forme de bilirubine. La bile est élaborée initialement dans les cellules parenchymateuses hépatiques (hépatocytes), puis modifiée par les activités de sécrétion et de réabsorption des cholangiocytes (cellules épithéliales biliaires). Le principal déterminant de la formation de la bile est un processus de filtration osmotique dû au transport actif des acides biliaires et de solutés osmotiquement actifs. Les transporteurs membranaires assurant la formation de la bile sont maintenant en grande partie identifiés (Poupon *et al.*, 2004)

I-4-3- Fonctions de Détoxification :

Le foie joue un rôle majeur dans la détoxification des médicaments et des toxiques. Il est l'organe de stockage de la vitB₁₂ (Domart, 1989). L'hépatocytes permet la détoxification de nombreuses substances grâce à des mécanismes produits toxiques se font soit avec l'acide glucuronique (glucurono-conjugaison), soit avec des ions sulfate (sulfo-conjugaison) ; ainsi sont

neutralisés divers médicaments (Ex : barbiturique). L'hépatocyte assure ainsi la glucurono-conjugaison des pigments biliaires (essentiellement la bilirubine) produits par les cellules de Kupffer et les macrophages bordant de la rate, déchets de l'hémoglobine évacuée par la bile (Encyclopédie, 2001).

Quand par ailleurs, une substance étrangère est introduite dans l'organisme de l'animal, elle peut être éliminée en nature, par l'un quelconque des émonctoire mais elle est soumise la plupart du temps à des modifications qui ont pour effet de diminuer sa toxicité et de favoriser son élimination. Si cette substance étrangère possède une structure chimique analogue à celle des métabolites normaux, elle sera susceptible d'être métabolisée par les mêmes mécanismes enzymatiques. Aucune différence essentielle ne sépare ces réactions de défense contre les «poisons exogènes» de celles qui président à l'élaboration des "excréta" normaux de l'organisme (Polonovski, 1971)

Les principales fonctions de détoxification hépatiques se résument en deux types de réactions essentielles :

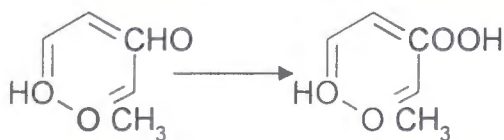
a- Détoxification par modification de structure :

Cette détoxification met en œuvre les grandes réactions classiques du métabolisme : oxydation, réduction et hydrolyse.

a-1 Oxydation :

L'oxydation peut porter sur des groupements très divers :

-Transformation d'un alcool primaire, d'un aldéhyde ou d'une cétone en acide :



Aldéhyde
Vanillique

Ac vanillique



o-nitro- acétophénone

Ac antivanilique

La toxicité de l'alcool méthylique (en particulier son action sélective sur le nerf optique) serait due non pas au méthanol lui même, mais à ses produits d'oxydation (aldéhyde et acide formique)

-**Méthyl Oxydation** : Se définit par le remplacement d'un radical méthyle par un carboxyle -
CH₃ → COOH

La méthyl-oxydation se fait en plusieurs temps, en passant par les stades

-CH₂OH et -CHO.

-La β . **Oxydation** : qui est un mode de dégradation normal des acides gras, et également subie par des substances anormalement introduites dans l'organisme.

-**Formation des phénols à partir de composés aromatiques** : l'un des hydrogènes du noyau étant remplacé par un groupement OH

-**Transformation des phénols au para diphénols** :

Désaturation de certaines substances hydro-aromatiques,

-**N-oxydation** : ou oxydation d'un azote tertiaire avec formation de N-oxyde.

-**Oxydation suivie de cyclisation** : dans la transformation de la paludrine antipaludique de synthèse, en une dihydrotriazine, qui semble représenter le produit responsable de l'activité biologique du médicament.

a-2 Réduction :

Les aldéhydes et les cétones de la série grasse peuvent être réduits en alcools, sauf les termes inférieurs qui sont généralement oxydés complètement, la réduction s'observe de même dans la série cyclique

a-3 Hydrolyse :

Ce type de réaction intéresse la transformation de certaines substances médicamenteuses, les estérases sériques se montrent en effet capables d'agir sur des substances non biologiques transformations hydrolytiques de la procaine en diethylamino-éthanol et acide p-aminobenzoïque,...etc.

b- Détoxification par conjugaison :

Les réactions de conjugaison, ou couplage, représentent des processus de détoxification très répandus. La substance étrangère E se lie à un métabolite M pour former le conjugué EM. Ces processus synthétique mettent en œuvre des métabolites ternaires des métabolites azotés, ou des métabolites soufrés.

b-1 -Conjugaison avec des métabolites ternaires :

- Glucuroconjugaison :

La conjugaison avec l'acide glucuronique est la plus fréquente des conjugaisons.

Elle est catalysée par le système enzymatique de la glucuronyltransférase et concerne les molécules possédant un groupement hydroxylé, carboxylé ou aminé. Les glucuronides sont très hydrosolubles ce qui explique la facilité avec laquelle ils sont éliminés dans l'urine et la bile. Dans quelques cas, les esters sont instables et après hydrolyse dans l'urine ou le plasma, redonnent la molécule mère (Lechat, 2005)

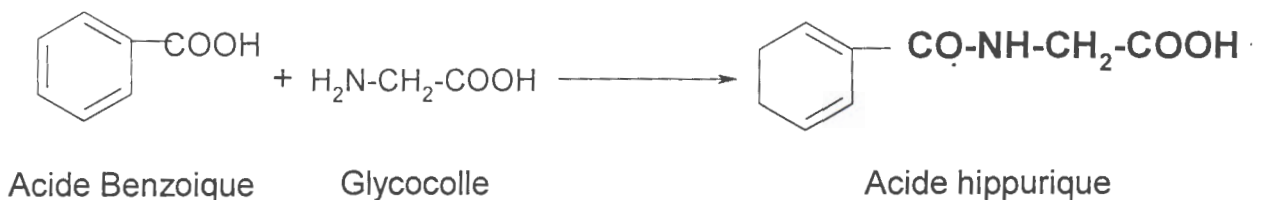
- Acétylation :

Chez l'homme les acides méta et para amino benzoïques sont éliminés sous forme de dérivés acétylés.

b-2 Conjugaison avec des métabolites azotés :

- Conjugaison avec le glycolle :

L'exemple le plus connu est le plus typique est celui de l'acide benzoïque avec le glycolle.



Cette condensation n'est possible qu'en présence d'ATP et de coenzyme A

-Conjugaison avec l'ornithine : l'ornithine remplace ici le glycolle.

-Méthylation : processus physiologique, permet l'élimination de nombreuses substances étrangères de la série hétérocyclique.

b-3 Conjugaison avec des métabolites sulfurés :

-Sulfo-conjugaison : les phénols qui prennent naissance au cours des putréfaction intestinales sont partiellement résorbés et se retrouvent dans l'urine sous forme de sels alcalins d'esters sulfuriques (Polonovski, 1971)

chapitre II

Hépatotoxicité

- *Toxicité Médicamenteuse*
- *Mécanisme d'Action des Toxiques au Niveau du Foie*
- *Principales Lésions Hépatiques*

II- HÉPATOTOXICITÉ

Les principales voies d'élimination des toxiques sont les voies hépato-biliaires et les voies rénales, le foie transforme les toxiques en métabolites eux-mêmes parfois très agressifs pour l'organisme. Les substances responsables d'action toxique sur le foie peuvent exercer leurs effets directement sur l'hépatocyte entraînant alors des lésions dans les régions périportales des lobules hépatiques. Le plus souvent, ces substances deviennent toxiques après leur oxydation par le système microsomiale, et les lésions débiteront alors dans les zones centro-lobulaires. Ces deux types d'hépatotoxicité directe sont dose dépendante. Il existe un autre type d'action toxique de mécanisme immuno-allergique causant une hépatotoxicité indirecte comme l'Halothame qui est indépendant de la dose mais très liée à la répétition des expositions (Christine, 1999).

II-1- Toxicité Médicamenteuse

Le foie joue un rôle essentiel dans le métabolisme de la plupart des médicaments, le médicament généralement liposoluble, est transformé par oxydation et/ou conjugaison au niveau du réticulum endoplasmique des hépatocytes en un métabolite hydrosoluble éliminé dans la bile ou beaucoup plus souvent dans les urines. Un assez grand nombre d'hépatites médicamenteuses soit la conséquence de la formation d'une quantité excessive de ces métabolites (Benhamou, 1980).

En générale, deux grands types d'hépatotoxicité chimique ont été reconnus :

- Le type toxique direct, qui apparaît avec une régularité prédictible chez des sujets exposés à un agent toxique et doses dépendantes
- Le type toxique idiosyncrasique où, l'apparition d'une hépatite est rare et non prédictible, la réponse dans ce cas n'est pas dose dépendante (Wilson, 1991).

II-1-1- Toxicité par les Médicaments Anticancéreux

Une substance antitumorale (anticancéreuse, antinéoplasique, cytotoxique se définit comme une substance cytotoxique qui détruit sélectivement les cellules en transformation.

Les médicaments anticancéreux ont pour but de tuer les cellules tumorales et le premier critère de deux efficacités est la réduction de la tumeur (Becouarn, 1993).

Les deux principaux problèmes limitant l'utilisation de la chimiothérapie sont la toxicité sur les tissus sains et le manque de spécificité qui provoque en grande nombre d'effets indésirables pouvant être graves (Lippincott *et al.*, 2001).

Tableau I : Modes d'Action des Médicaments Anticancéreux (Bentué-Ferrer, 2002).

Mode D'action	Familles et sous familles		Mécanisme d'action	Médicament	Exemple	
Interaction indirecte avec l'ADN	Inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques	Les anti-métabolites	Analogues des purines	-pro drogues pré métabolisation intracellulaire -inhibition enzymatique à différents niveaux de la voie de synthèse des purines -Incorporation dans l'ADN	Mercaptopurine	Purinethol (2) (1961)
			Analogues des pyrimidines	-Pro drogues - Incorporation dans L'ADN -Mécanisme d'action complexe	Cytorobine (Arac)	-Arocytine -Cytorbol (1985)
			Analogue de l'acide folique	-Blocage du cycle de folote -Inhibiteur spécifique de la Thymidilate synthétase -Inhibe les ADN polymérase	-Méthotrexate -Raletitrexate -Gencitabine	-Lebertrexate (1962) -Tomdex (1996) -Gemzar (1996)
	Substances inter- agissant avec les protéines	Inhibiteurs de la ribonucléotide réductase	Inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I	Ne s'intercalent pas dans l'ADN mais stabilisent le complexe de clivage, empêchant l'étape de religation provoquent une coupure définitive des brins d'ADN	Etoposide	-Etopophos -compta (1975)
			Inhibiteurs de l'ADN topoisomérase III			
		Tubuline	Alcaloïde de la pervenche	Empêchent la formation du fuseau mitotique et du maintien du cytosquelette en métaphase	-Vinblastine -venorelbine	-Velbé (1975) -Navelbine (1989)
		les toxanes	Empêche la séparation des chromosomes en anaphase	Paclitaxel -docetaxel	-Toxol (1993) -Taxoténe (1996)	
	Interaction directe avec	Asparaginase		Entraîne une diminution de l'asparagine du plasma et des tissus.	L-asparaginase	-Kidrolase (1971)
Agents intercalant		-Empêche la progression des	-Antracyclines :	-zavedos (1991)		

l'ADN		ARN et des ADN polymérase -Inhibent la réplication, transcription----- radicaux libères	idourubicine, épirubicine -Anthracénediones	-farmorubicine (1990)
	Agents électrophile	-Fixation sur l'ADN en empêchant la réplication	Al kylant :	Caryolysine (1949)
			Moutarde a l'ozote	-Bicnu (1981) -Hycantin (1985)
			Nitroso-urées : -carmustine -topotécan	Amétycine : (1974)
		Dérivé de platine : -carboplatine -cis platine	-paraplatine r (1989) -cisplatine (1979)	
Agents scindant	Provoquent des coupures et cassures mono et bi caténaire	Topotécan	Hycantin	

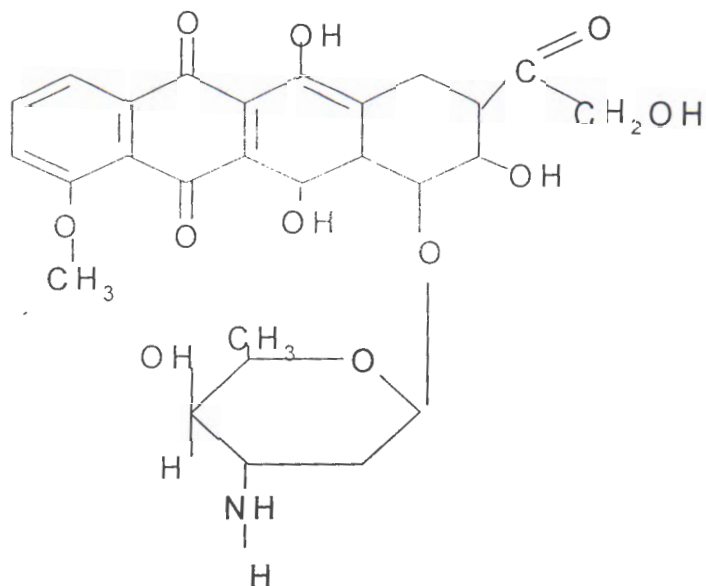


Figure 4 : La Structure de l'épirubicine (Crooke *et al.*, 1978)

a-2- Classes chimiques :

- ANTRACYCLINES
- GLUCOSIDE
- NAPHTACENE

Molécule de base : EPIRUBICINE (Coombes *et al.*, 1996).

a-3-Mode d'action :

Le mode d'action de l'épirubicine n'a pas été pleinement élucidé, mais il semble reposer sur la capacité de cet agent à se lier aux acides nucléiques par intercalation du noyau plat anthracycline entre les deux brins d'ADN (Christman, 1986).

L'épirubicine réalise une liaison intercalaire avec l'ADN, la topo isomérase II et génère des radicaux libres oxygénés toxiques (Khayat, 1999).

L'épirubicine inhibe la topoisomérase II, enzyme impliquée dans le déroulement de la double chaîne d'ADN lors de sa réplication, elle posséderait une activité antinéoplasique identique à la doxorubicine mais serait moins myélotoxique, moins cardiotoxique et moins alopeciant. (Cookel & Faulds, 1997).

a-4- posologie et voies d'administration :

-Le calcul habituellement fondé sur la surface corporelle (Khayat, 1999), et la posologie est variable suivent les protocoles : 50 à 75 mg/m²/cycle (toutes les 3 à 4 semaines) (Feld *et al.*, 1989).

-L'épirubicine doit être administré par voie intraveineuse en perfusion, et ne doit pas être administré par voie intramusculaire ou sous cutanée (Brambillac *et al.*, 1986).

a-5- Pharmacodynamie :

L'épirubicine est un médicament à activité Anticancéreuse. C'est un immunosuppresseur cytostatique ou agent intercalant (Vidal, 2002), antinéoplasique (Cookel & Faulds, 1997).

L'épirubicine appartient au groupe des antibiotiques antracyclines, il se lie à l'ADN et inhibe l'action des polymérase des acides nucléiques (Vidal, 2002).

a-6- Pharmacocinétique :

- Absorption :

Il est Administré exclusivement par voie veineuse, et non résorbé par voie orale (Cookel & Faulds, 1997).

-Répartition :

Importante diffusion tissulaire.

Augmentation de l'aire sous la courbe et diminution de la clairance plasmatique en cas de métastase hépatique (Cookel & Faulds, 1997).

-Demi-vie :

La demi-vie de l'épirubicine est de 35 heures. La concentration plasmatique décroît de façon tri exponentielle : une phase très rapide ($T_{1/2} < 2h$), une phase plus lente ($T_{1/2} : 2 \text{ à } 8h$) et une phase très lente ($T_{1/2} : 30h \text{ à } 40h$) (Twelves *et al.*, 1992).

-Métabolisme :

Le Métabolite principal isolé est l'épirubicinol (Epirubicine 13 Hydroxylée) (Weemen *et al.*, 1984), il y a aussi la formation des dérivés glucurocoujugués de l'épirubicine (Cookel & Faulds, 1997).

-Elimination :

10 à 15 % de la dose administrée sont retrouvées dans les urines en 7 jours (Wills *et al.*, 1990). L'excrétion biliaire est la principale voie d'élimination et environ 40% de la dose administrée sont récupérés dans la bile dans un délai de 72 heures (Hochester *et al.*, 1986).

a-7- Effets secondaires et toxicité :

La toxicité aiguë de l'épirubicine administrée par voie intraveineuse a été étudiée chez la souris, le rat et le chien. Chez la souris, la mort a été directement liée à la dose d'épirubicine administrée par injection unique. Les souris sont mortes entre le 4^e et le 180^e jour après l'injection. La dose létale moyenne (DL₅₀) calculée après la stabilisation de l'état était de 15,06 mg/kg.

Chez le rat, la mort a été directement liée à la dose d'épirubicine administrée par injection unique et est survenue entre le 4^e et le 15^e jour après l'injection. La DL₅₀ calculée à la stabilisation s'élevait à 13,95 mg/kg.

Chez le chien, l'injection d'une seule dose de 2 mg/kg s'est révélée mortelle, mais on peut considérer celle d'une dose plus faible (1 mg/kg) comme se situant juste à l'intérieur des limites de sûreté.

Des études ont montré que la toxicité chronique de l'épirubicine chez le lapin et le chien, en administrant cet agent par voie IV 3 jours de suite par semaine pendant 6 semaines au lapin et, pendant 6 et 13 semaines au chien. D'après les résultats obtenus chez le lapin, le mode d'action pharmacologique et toxicologique de l'épirubicine est très comparable à celui de la doxorubicine. Qualitativement parlant, l'épirubicine est très comparable à la doxorubicine. Quantitativement parlant, la toxicité générale et myocardique de l'épirubicine est moins grande d'un tiers environ que celle de la doxorubicine (Pfizer, 2005)

L'épirubicine présente plusieurs effets toxiques :

-Toxicité cardiaque, insuffisance cardiaque chronique, infarctus de myocarde, myocardiopathie, alopecie, nausée et vomissement (Steinherz & Steinherz, 1991)

-Anémie, leucopénie et thrombopénie, diabète insipide (Coombes *et al.*, 1996).

b- Méthotrexate :

b-1- Définition et structure :

Le méthotrexate (MTX) est largement utilisé en dermatologie depuis nombreuses années (Roenigk *et al.*, 1998 ; Zachariaeh, 2000).

En cancérologie, le méthotrexate a une activité démontrée et utilisé à des posologies très différentes (AL-Awadhi *et al.*, 1993).

Le méthotrexate (fig. 5) est un analogue structural de l'acide folique (Khayat, 1999).

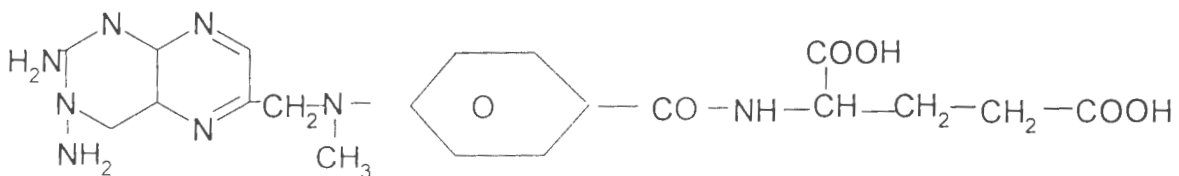


Figure 5 : La Structure du méthotrexate (Cotten, 1997)

b-2- Mode d'action :

Le méthotrexate est un analogue de l'acide folique qui inhibe de manière compétitive la dihydrofolate réductase (DHFR) intra cellulaire (Morgan *et al.*, 1994), enzyme qui permet la conservation de l'acide folique en folates réduits (Khayat, 1999).

Il en résulte une inhibition de la synthèse des purines, des acides nucléique et certains acides aminés (Morgan, *et al.*, 1994).

L'affinité de la DHFR pour le méthotrexate est supérieure à son affinité pour l'acide folique. Cela explique que la toxicité aiguë du méthotrexate utilisé à forte doses ne soit pas antagonisées par l'acide folique mais par l'acide folinique (N5 formyle THF) qui court – circuit l'étape enzymatique bloquée (AL-Awadhi, *et a.*, 1993).

b-3- Posologie et voie d'administration :

30 à 75 mg/m² à injecter en intramusculaire ou intraveineux, 1 à 2 fois par semaine, et 10 à 15 mg dose total à injecter en intrarachidien. (David., 1999).

b-4- Pharmaco- cinétique :

-A la dose thérapeutique (10mg/m²/jour), l'absorption par muqueuse digestive est quasi complète (Lechat, 1982).

- Dans le sérum, 50 à 70% du méthotrexate est lié de manière réversible à l'albumine (Bournerias. Chosidowo, 1994).

- 50 à 90 % du méthotrexate sont éliminés par voie rénale par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire (Bournerias. Chosidowo, 1994).

- La demi- vie d'élimination est de 10 à 27 heures. (Bournerias. Chosidowo, 1994).

- l'élimination dans la bile et dans les fèces et de 10 % (Bournerias. Chosidowo, 1994).

b-5- Toxicité :

- La toxicité principale du méthotrexate est hépatique cumulative (Pearce, Braunstein, 1996), une stomatite ulcéreuse, des nausées et des vomissements sont des incidents fréquents (Lechat, 1982).

-Alopénie, dermatite, troubles hépatiques par foies cirrhogènes, infiltrats pulmonaire (Lechat, 1982).

II-2 Mécanisme d'Action des Toxiques au Niveau du Foie :

Le foie est le carrefour du métabolisme le l'organisme. En effet, il reçoit de la veine porte à coté des produits résultants du métabolisme alimentaire, les toxiques arrivant du contact de cellule hépatique. Ces toxiques sont nombreux et ont dans le domaine de la chimiothérapie anticancéreuse (Lahouel, 1985). D'autre part, des études histologiques hépatiques faites à plus long terme ont démontré, le caractère évolutif des lésions hépatiques.

Outre les modifications biochimiques observées telle une augmentation de la bilirubine, des phosphatases alcalines et des transaminases. Des différenciations particulières des régions péri-canaliculaires, avec présence d'un réseau de micro-filaments contractiles en excluant les canalicules et parvenant jusqu'au centre des microvillosités ont été montrés, Le réseau non seulement maintient la structure des canalicules mais grâce à l'action des faiblis joue un rôle actif dans la contraction canaliculaire et dans l'écoulement biliaire (Christine, 1999).

II-3- Principales Lésions Hépatiques :

Le foie est une cible fréquente des toxiques pour plusieurs raisons, d'abord la plupart des toxiques pénètrent dans l'organisme par le tube digestif, et après l'absorption, ils sont transportés par la veine porte vers le foie, cependant la toxicité peut s'exercer sur différents organites des cellules hépatiques, conduisant vers divers effets toxique (Lu, 1992).

Les principales altérations de l'anatomie hépatique, par des produits chimiques ou médicaments, sont présentés sur le tableau II qui montre plusieurs classes d'agents chimiques des exemples du type de lésions hépatiques produites par ceux-ci :

a- Cytotoxicité :

L'indexe thérapeutique de la majorité des agents anticancéreux reste faible et leur utilisation limitée par les toxicités aiguës et chronique (Shorderet, 1992).

L'emploi des doses massives de médicaments entraîne obligatoirement effet toxique pour les cellules saines (Sevenet, 1994).

b- Sélectivité :

La sélectivité des anticancéreux est faible et toutes les cellules de l'organisme qui ont des capacités de reproduction sont atteintes (Becouarn, 1993).

Malgré des progrès considérables réalisés dans la spécificité des molécules développées ils restent incapables de respecter totalement les cellules normales (Schorderet, 1992).

II-1-2- Mode d'action des anticancéreux :

Les substances chimiques ainsi utilisées agissent sur les cellules tumorales de différentes manières, le tableau I résume les modes d'actions des anticancéreux (Bentué-Ferrer, 2002).

II-1-3- Classification :

Selon des études récentes la classification des anticancéreux basée sur la structure chimique des molécules et leur mécanisme d'action, on distingue 4 groupes d'anticancéreux (Malliti *et al.*, 2004) :

a- Les cytotoxiques :

Ce sont des anticancéreux qui provoquent des altérations métaboliques et morphologiques de la cellule conduisant à la mort, quatre classes d'anticancéreux cytotoxiques sont citées :

Les alkylants, les antimétabolites, les poisons du fuseau et les inducteurs ou stabilisants de coupures d'ADN (dont les inhibiteurs de topoisomérase I et II) (Malliti *et al.*, 2004).

b- Les Cytostatiques :

Ce sont des anticancéreux qui agissent par blocage du cycle d'évolution naturelle de la cellule. À ce jour les principaux cytostatiques sont les dérivés hormonaux et les agents anti-hormonaux utilisés des certains hormono-dépendants (Malliti *et al.*, 2004).

c- Les Anticorps Monoclonaux :

Ce sont des anticorps spécifiques de protéines présentes à la surface des cellules malignes (ex : Mabthéra (Rituximad) anti-CD20 utilisé dans les lymphomes nonhodgkiniens) (Malliti *et al.*, 2004).

Tableau II : Principales Lésions Hépatiques

Modifications Morphologiques Principales	Définition de la lésion	Type de l'agent	Exemple de médicament
Cholestase	Stagnation de la bile dans les voies biliaires situées à l'intérieur du foie, due à une obstruction de ces voies ou à une diminution de la sécrétion de la bile.	<ul style="list-style-type: none"> -Anabolisant -Antithyroïdien -Chimiothérapie -Contraceptif oral -Hypoglycémiant oral -Tranquillisant 	<ul style="list-style-type: none"> -Methyle testostérone -thiazol - Erythromycine - Noretynodrel - Chlorpanide - Chorpromazine
Stéatose	Accumulation de graisses à l'intérieure de cellule qui, à l'état normal n'en contient que de très faibles traces (Lu, 1992).	<ul style="list-style-type: none"> -Chimiothérapie -Anti-comitial -Anti-arythmique 	<ul style="list-style-type: none"> -Tétracyclines -Acide valproïque (valproate de sodium) -Amiodarone
Hépatite (cytolyse)	Toute inflammation du foie, généralement causée par une infection virale mais peut être due à des agents ou des poisons chimiques, à des médicaments, à des bactéries ou toxine bactériennes (Encyclopédie, 2004)	<ul style="list-style-type: none"> -Anesthésique -anti-convulsivant -anti-hypertensif -chimiothérapie -laxatifs 	<ul style="list-style-type: none"> -Halothane -Diphénylhydantoïne - αmétyldopa -Isoniazide -Chlorothiazide -Oxyphénisatine
Toxique (nécrose)	-Implique la mort des hépatocyte, peut être locale (centro-lobulaire, médiane ou périphérique) ou généralisée, mort cellulaire ou tissulaire (Lu, 1992)	<ul style="list-style-type: none"> - Hydrocarbure -Métal - Champignon -Solvant 	<ul style="list-style-type: none"> -Tétrachlorure de carbone ou phosphore -Avanite phalloïde -paracétamol Diméthyl-formamide
Granulomes	Tumeur de nature inflammatoire, formé par la prolifération des cellule tel que le tumeur du foie	<ul style="list-style-type: none"> -Anti-inflammatoire -Chimiothérapie -inhibiteur xanthine oxydase 	<ul style="list-style-type: none"> -phényl butazone -sulfamide -Allo-purinol

III- STRESS OXYDATIF :

III-1-Introduction et définition :

Depuis quelque année, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du " stress oxydant ", c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygènes toxiques. Ces derniers sont produits de manière continue de faibles quantités par le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène (Gutteridge, 1993).

Le stress oxydatif correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire, induit soit par production excessive de radicaux libres, soit par diminution de la capacité de défense antioxydante (Morel & Barouki, 1999).

III-2- Radicaux libres :

III-2-1- Définition :

Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécules possédant un électron non apparié (Célibataire) sur leur orbitale externe, (Jadot, 1994). Ce déséquilibre n'est que transitoire, et comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Novelli, 1997).

En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l'oxygène. Les espèces réactives de l'oxygène (Réactif oxygène species : ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également d'autres composés non radicalaire très réactifs (ex : hydroperoxydes ROOH et peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Myara, 2002).

III-2-2-Différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène :

Ils interviennent dans la voie de réduction univalente de l'oxygène il s'agit du :

- Radical superoxyde (O₂^{•-})
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).
- Radical hydroxyle (OH[•])
- Des radicaux alcoxy (RO[•]) et peroxy (ROO[•])
- L'oxygène singulet (¹O₂[•]) (Jadot, 1994)
- Radical hydroperoxyde (HOO[•]) et l'Hydroperoxyde (ROOH)
- Oxyde nitrique (NO[•]) et peroxydinitrite (ONOO)
- Hypochlorite, ClO

Pouvoir oxydant: OH[•] > RO[•] > HOO[•] > ROO[•] > NO[•]. (Myara, 2002)

-Radical Superoxyde $O_2^{\bullet-}$:

L'anion superoxyde est produit par l'auto-oxydation de nombreuses molécules intracellulaires, soit au cours de réaction enzymatiques survenant dans la chaîne respiratoire, soit comme conséquence de l'activité de différents facteurs exogènes, radiation ou produits chimiques toxiques (Jadot, 1994).

-Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , qui n'est pas un radical libre, peut être formé secondairement à la dismutation de $(O_2^{\bullet-})$ par la superoxyde-dismutase ou produit par réduction bivalente de l'oxygène grâce à un grand nombre de déshydrogénases, notamment l'acylCoA déshydrogénase (Jadot, 1994).

-Radical hydroxyle (OH^{\bullet}) :

C'est un puissant oxydant capable de réagir avec une multitude de molécules par perte d'un hydrogène, addition ou transfert d'un électron. Sa formation peut se faire à partir de l'eau oxygénée en présence de minimes quantités de fer suivant la réaction décrite par Haber-Weiss. L'action d'un certains nombre de médicaments antinéoplasiques entraîne également sa formation (Jadot, 1994).

-Oxygène singulet ($^1O_2^*$) :

L'oxygène singulet est la forme "excitée" de l'oxygène moléculaire. Il est formé en moindre quantité que les radicaux libres précédents mais il est important car il apparaît lors de la peroxydation lipidique (Jadot, 1994).

-Radicaux alcoxy (RO^{\bullet}) et peroxy (ROO^{\bullet}) :

Ces radicaux sont majeurs pour le maintien de la réaction en chaîne radicalaire une fois celle-ci amorcée à l'intérieur d'un acide gras insaturé. Ils peuvent être générés par l'action de $(O_2^{\bullet-})$, OH^{\bullet} et de l'oxygène singulet sur ces acides gras (Jadot, 1994).

III-2-3- Sources des radicaux libres:

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation des molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P-450. Ce mécanisme est souvent incriminé pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, ou de nombreux médicaments; mais il se produit aussi avec des composés endogènes comme l'acide lévulinique et surtout les catécholamines.

Les métaux toxiques (Chrome, cuivre, vanadium), mais aussi le cuivre et le fer, libres génèrent des radicaux hydroxyles, très réactifs, à partir de l'espèce peu réactive H_2O_2 , par une réaction appelée réaction de Fenton. Les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres, d'une part parce qu'elles exacerbent la phagocytose, d'autre part parce que leur surface est tapissée de sels de fer. Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X, soit en activant les molécules photosensibilisantes, lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets qui vont par ce mécanisme produire des anions superoxydes et de l'oxygène singulet (fig.6) (Dalton *et al.*, 2002).

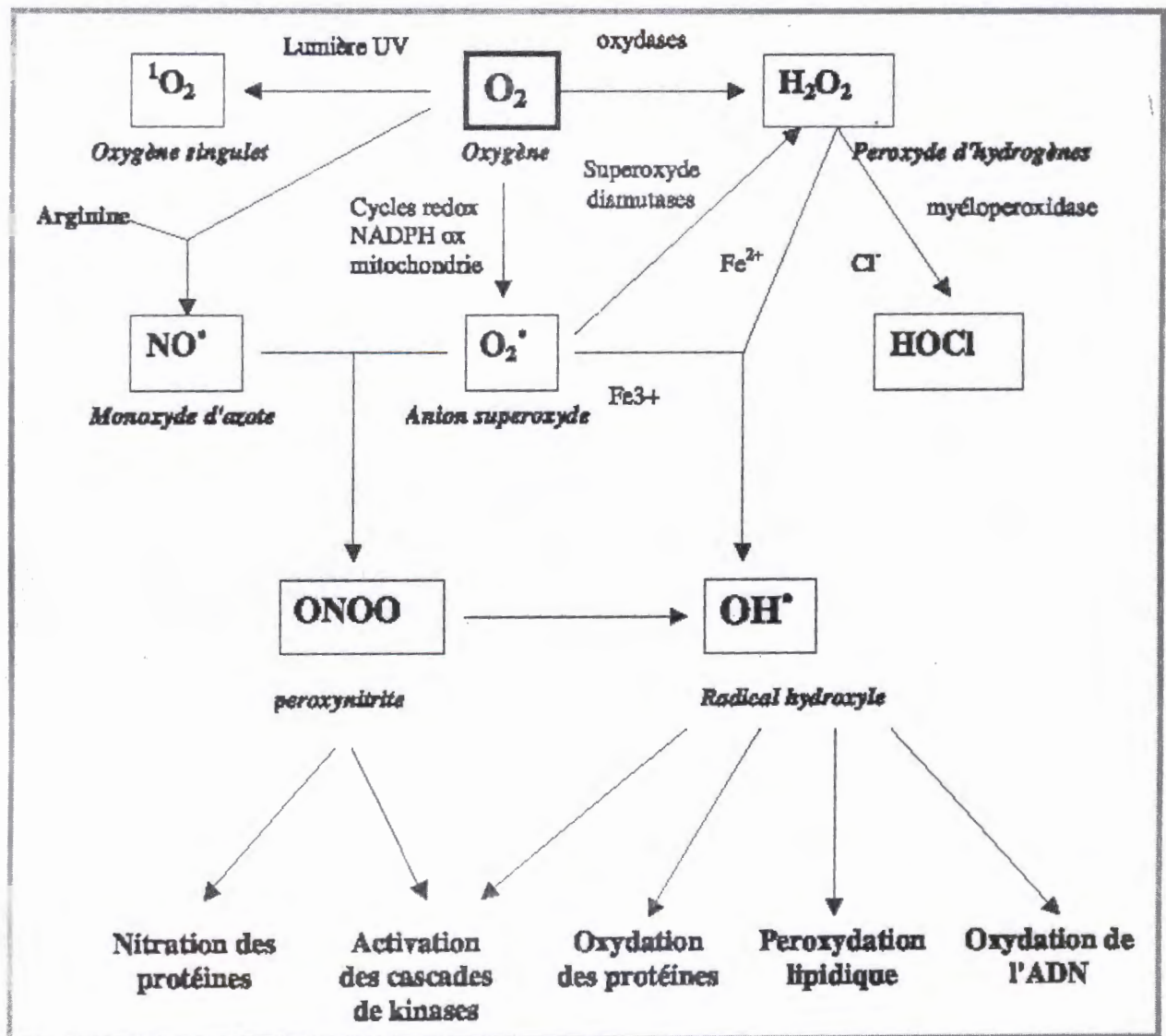


Figure 6 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003)

III-2-4-L'Origine cellulaire des ROS :

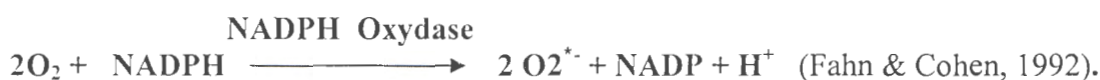
Au niveau des mitochondries, au cours du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire

(membrane interne de la mitochondrie), du radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) est produit par réaction de l'oxygène avec un radical semi-ubiquinone (Turrens *et al.*, 1985).

Les ROS produits par la respiration cellulaire dans les conditions physiologiques, correspondent à 4% de l'oxygène rentrant dans la chaîne respiratoire (Chance *et al.*, 1979).

Fort logiquement, la production mitochondriale des ROS dépend de la disponibilité en oxygène, elle augmente avec la pression partielle en oxygène (Boveris & Chance, 1989). La production de radicaux libres varie selon le type des substrats de la chaîne respiratoire (Taylor *et al.*, 1995).

Les cellules phagocytaires possèdent une enzyme membranaire la NADPH oxydase, qui est spécialisée dans la fabrication du ($O_2^{\bullet -}$):



Au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion la xanthine- déshydrogénase est modifiée en xanthine oxydase qui génère du ($O_2^{\bullet -}$) en présence d' O_2 et de xanthine ou d'hypoxanthine (Fahn & Cohen, 1992).

III-3-Système de défense antioxydants :

Les antioxydants définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Les antioxydants peuvent agir à deux niveaux en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés (antioxydants primaires) ou en épurant les radicaux libres oxygénés (antioxydants secondaires) (Halliwell, 1994).

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes pour contrôler leurs niveaux de ROS. une stratégie utilisée et de nature enzymatique est constituée principalement de trois enzymes. Il s'agit de la SOD, de la catalase et de glutathion (GPx) (Fig. 11) (Kinsky, 1989).

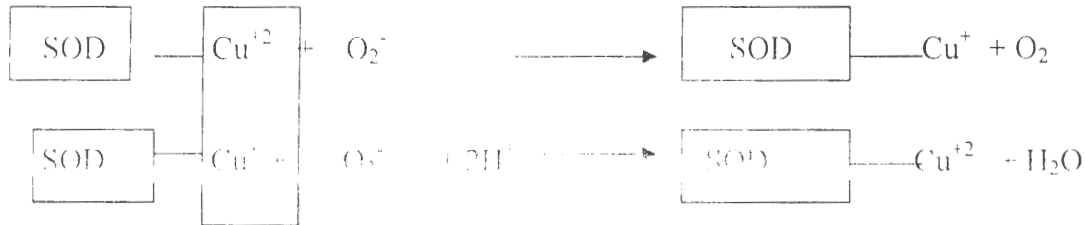
III-3-1- Superoxyde Dismutase (SOD) :

La SOD appartient à la famille des métalloenzymes, dont le rôle est d'éliminer les ions superoxydes, nocifs pour toutes les structures cellulaires, (Jadot, 1988) en peroxyde d'hydrogène par dismutation selon la réaction suivante :



Trois classes de SOD catalysant toutes la même réaction ont été identifiées et se distinguent par le cofacteur métallique qu'elles contiennent (Vancamp *et al.*, 1990).

Le principe de la dismutation catalysés par l'enzyme est :

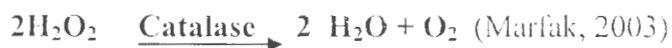


(Pelmont, 1993).

III-3-2- La catalase :

La catalase est une enzyme non confirmiste qui réagit directement avec la première molécule de substrats (peroxyde) pour former un complexe ES, ce dernier n'est pas exactement assimilable à un complexe de michaelis, mais plutôt à une combinaison covalente entre enzyme et substrat (l'enzyme a déjà été oxydée par le peroxyde). En régime normal chaque molécule de catalase qui est tétramère ne fixe H₂O₂ que sur un seul hème parmi les quatre, parfois sur deux, car certaines catalases n'ont pas quatre hèmes identiques (Pelmont, 1993).

La catalase est principalement présente dans les peroxysomes de diverses cellules, elle transforme le peroxyde d'hydrogène en simple molécule d'eau (Gonzales, 1984) selon la réaction :



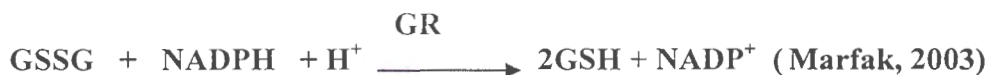
III-3-3- Les Glutathion peroxydases :

Les peroxydases peuvent opérer facilement à concentration faible de H₂O₂. Certaines peroxydases, comme la glutathion peroxydase, sont actuellement considérées comme participant à la défense de l'organisme contre les peroxydes (Pelmont, 1993).

La glutathion peroxydase (GPx) est un sélénoenzyme (Se-GPx) qui utilise la glutathion réduite (GSH) comme cofacteurs. Elle détruit l'H₂O₂ en eau et aussi tous les peroxyde lipidiques (ROOH) (où R représente un acide gras poly insaturé) (Matkovics, 1982), Selon les réactions suivantes :



La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG. Au cours de cette réaction la glutathion utilisée un cofacteur, le NADPH :



Cette réaction produit du NADP⁺ qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme, le G6PD (Glucose 6 phosphate déhydrogénase)



Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxication active peut être résumé dans le schéma (fig. 7) suivant :

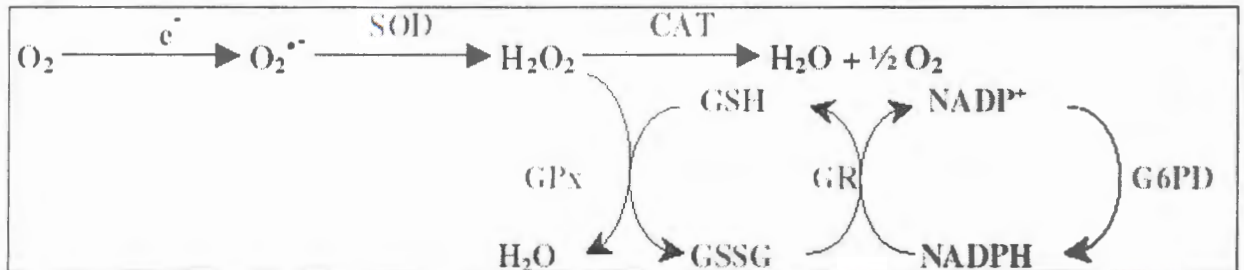


Figure 7 : Mécanisme de détoxication enzymatique (SOD-Catalase-Glutathion) (Marfak, 2003)

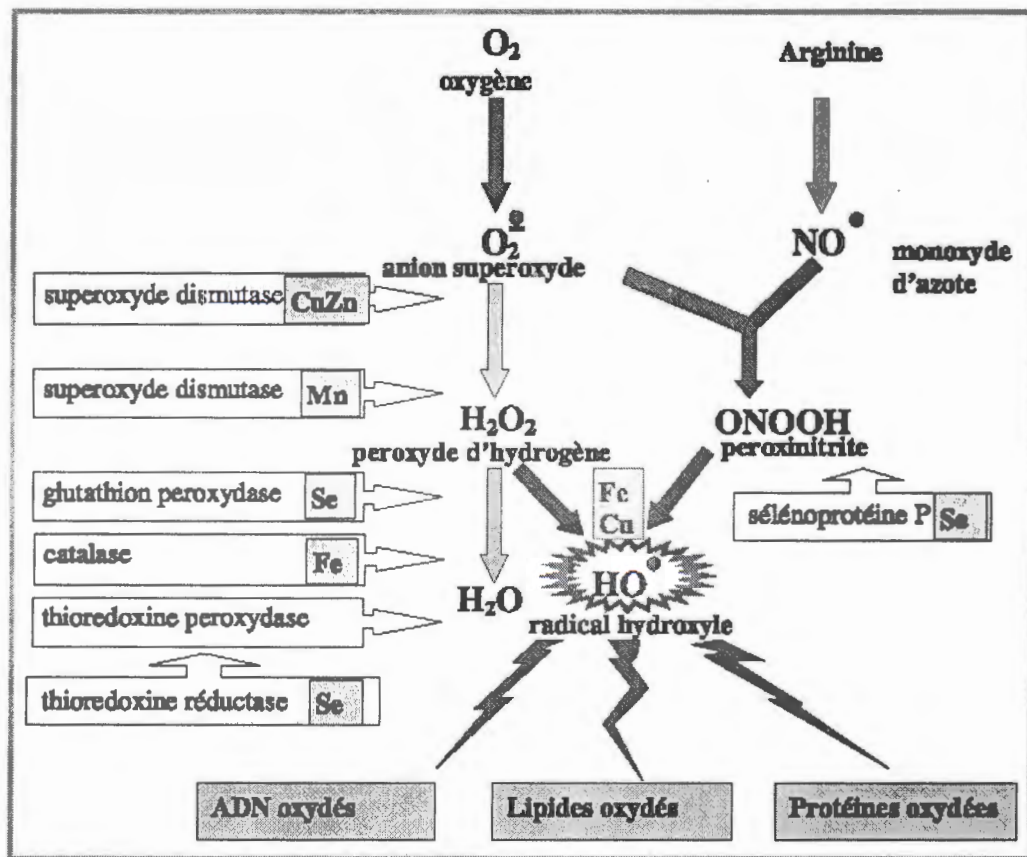


Figure 8 : Mode d'Action des Principaux Systèmes Enzymatiques Antioxydants et de leurs Cofacteurs Métalliques (Favier, 2003)

Chapitre IV

Exploration Fonctionnelle du Foie

- *Paramètres Biochimiques Sériques Marqueurs de
la Fonction Hépatique*
- *Les Enzymes Cytosoliques Hépatiques*

IV – EXPLORATION FONCTIONNELLE DU FOIE :

IV -1- Paramètres Biochimiques Sériques Marqueurs de la Fonction Hépatique :

Les tests biochimiques réservés à l'exploration de la fonction hépatiques comportent un ensemble d'analyses biologiques des paramètres biochimiques marqueurs tels que : les transaminases (TGO ou AST, TGP ou ALT).

IV-1-1- Les Transaminases :

Les transaminases sont des enzymes catalysant le transfert du radical NH_2 d'une fonction amine sur un récepteur cétonique, elles ont comme coenzyme le pyridoxal phosphate. L'Hypertransaminasémie est observée en cas de lésions hépatocytaires (Domart, 1989). Les transaminases sont mesurées dans le sérum sanguin, elles diffèrent entre elles par leur spécificité d'action (Borel, 1984).

a- Glutamate Oxaloacétique Transaminase (TGO) :

Glutamate oxaloacétique transaminase (ou Aspartate Aminotransférase) existe sous deux formes localisées différemment à l'intérieur de la cellule. Elle catalyse la synthèse et la dégradation de l'acide aspartique et de l'acide glutamique par l'intermédiaire de deux oxacides correspondants, l'acide oxaloacétique et l'acide oxoglutarique (Fig. 9) (Domart, 1989).

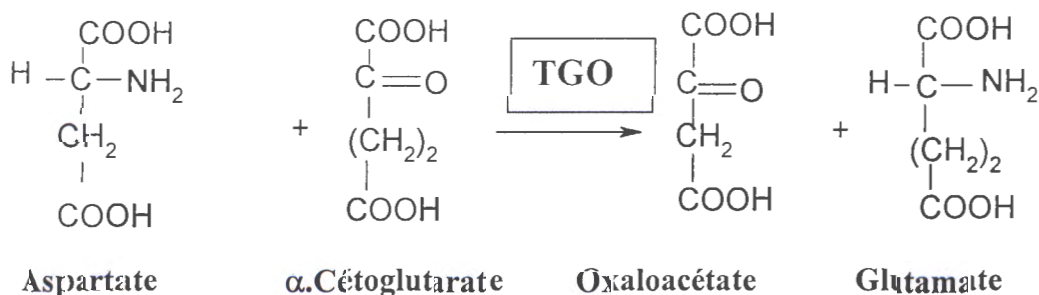


Figure 9 : Réaction chimique catalysée par la TGO (Domart, 1989).

TGO est présent en concentrations voisines dans le tissu hépatique et myocardique, sa teneur dans les muscles squelettiques et les reins est environ 70% de celles des tissus précédents (Borel, 1984).

b- Glutamate Pyruvate Transaminase (TGP) :

La glutamate pyruvate transaminase (ou Alanine Aminotransférase) catalyse le transfert réversible du groupement aminé de l'alanine sur le 2-oxo-glutarate avec formation du pyruvate et du glutamate (Fig. 10). Elle est plus localisée dans le foie mais aussi dans le rein et d'autres organes (Domart, 1989).

Sa forte concentration dans le foie est sa localisation exclusivement cytoplasmique explique sa relative spécificité des troubles hépatiques (Borel, 1984).

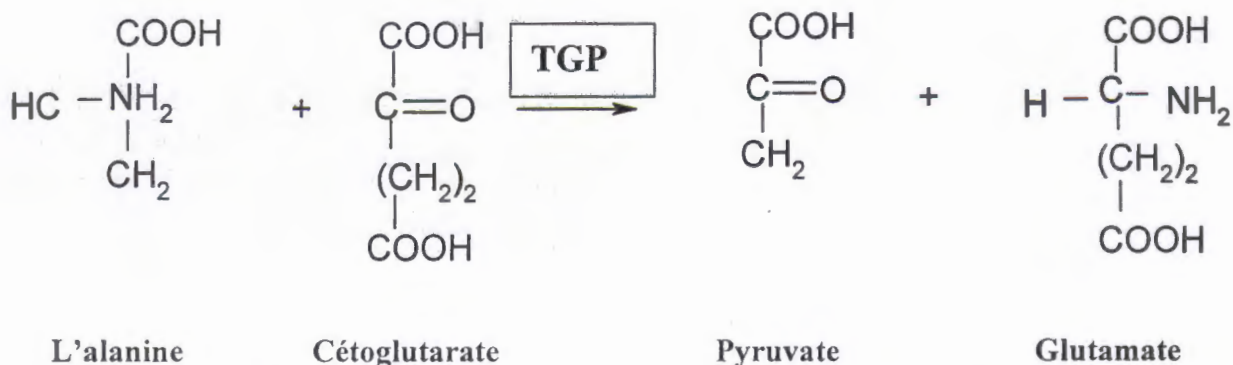


Figure 10 : Réaction chimique catalysée par le TGP (Domart, 1989).

IV-2- Les Enzymes Cytosoliques Hépatiques:

IV-2-1- Superoxyde Dismutase (SOD):

Une Superoxyde Dismutase (EC.1.15.11) est une métallo-enzyme contenant selon les cas du fer, du cuivre, du manganèse, du zinc (Pelmont, 1993). Les SOD existent sous plusieurs isoformes dont la structure d'ensemble est très bien conservée lors de l'évolution (Zelko *et al.*, 2002). Il y a 3 catégories de SOD (Tableau III)

Tableau III : Catégories des SOD et leur localisation :

Les dismutases			Localisation
Dismutases type	Cu-Zn		Plasma
Dismutases à	Mn		Bactéries, mitochondries
Dismutase à	Fe		Périplasma des bactéries

La SOD Cu-Zn est une protéine bleu vert, de masse 35000, contenant 0.38% de cuivre (Pelmont, 1993). Sa structure est homodimérique. L'atome de zinc permet sa stabilité structural alors que l'atome de cuivre intervient dans son activité enzymatique (Tainer *et al.*, 1997). Chez les mammifères, il à été bien établi que l'activité catalytique de la SOD Cu-Zn dépend des concentration plasmatique en cuivre et en zinc (Aruand *et al.*, 1991).

IV-2-2- Catalase :

La plupart des catalase sont des molécules composées de 4 sous unités identique, avec une masse de 250KD. Chaque sous unité renferme un ion Fe⁺³, logé en principe dans un noyau héminique à l'état oxydé : C'est la protohémine (Pelmont, 1993).

La catalase est présente dans divers tissus, dont le foie (en grande quantité), ont des microcorpuscules cytoplasmiques entourés d'une membrane simple est appelés peroxysome, qui sert à protéger la cellule des effets toxiques du peroxyde d'hydrogène (Arms & Karen, 1989).

L'absence de la catalase provoqué accident génétique peut être composé par destruction de H_2O_2 catalysée par les peroxydase et par la Glutathion peroxydases (Pelmont, 1993).

IV-2-3-Glutathion peroxydase :

Ces enzymes ont en commun une structure tétramérique, chaque tétramère possédant un atome de sélénium dans son site actif, très fortement fixé à la chaîne peptidique, puisque incorporé sous forme de sélénocysté dans la séquence primaire (Nève *et al*, 1989).

Toutes les peroxydases sont comme la catalase des protéines hémiques (Fe^{III}) à haut spin (Pelmont, 1993).

Elle sont localisée dans le cytosol et les mitochondries des cellules (Gonzales, 1984).

Etude

PRACTIQUE

Les chapitres

- * *Matériel et Méthodes*
- * *Résultats et Interprétations*
- * *Discussions*



chapitre I

Matériel et Méthodes

- *Matériel*
- *Méthodes*



Introduction :

Le présent travail a été effectué au niveau de l'animalerie et les laboratoires de biologie de l'université de Jijel. Il s'articule sur l'exploration biochimique et enzymatique de l'hépatotoxicité. Quelques paramètres biochimiques sériques marqueurs de la fonction hépatique ont été analysés tels que les enzymes (TGO, TGP) ainsi que des paramètres enzymatiques cytosoliques (SOD, catalase et Glutathion).

I- Matériel et Méthodes :**I-1-Matériel :****I-1-1-Matériel Biologique :**

L'étude de l'hépatotoxicité a été réalisée sur des rats albinos de souche *wistar* (*Ratus ratus*) des deux sexes, provenant de l'Institut Pasteur (Alger). Ces rats sont répartis en 3 lots chacun contenant 5 rats :

Lot 1 : lot témoin, de poids moyen $66,78 \pm 3,34g$

Lot 2 : lot traité par un médicament anticancéreux (Epirubicine) avec une moyenne de poids de $126 \pm 16,01g$.

Lot 3 : lot traité par une association de deux médicaments anticancéreux (Epirubicine et Méthotrexate), le poids moyen des animaux est de $82,86 \pm 4,68g$.

Les 15 animaux sont séparés suivant les lots 1, 2 et 3 dans 3 cages respectant les dimensions : 42cm de long x 31cm de large x 16cm de hauteur. Ces cages sont soumises aux conditions environnementales suivantes :

La température de 21 à 22C°, la luminosité 12h/24h et l'aération réalisée à l'aide de deux extracteurs.

I-1-2- Matériel Chimique :

Les médicaments utilisés sont l'épirubicine et le méthotrexate administrés par voie intraveineuse au niveau de la veine caudale en utilisant des seringues de 1 ml. Le premier médicament est administré en *bolus* dose unique (Feld *et al.*, 1989), le deuxième est administré en deux doses séparées par un intervalle de temps de 7 jours selon les doses prescrites (Khayat, 1999)

Ces deux produits sont présentés sous deux formes médicamenteuses différentes.

L'épirubicine est une poudre de 50mg qui a été diluée dans 25ml d'eau distillée soit une solution de concentration 2mg/ml. La dose administrée de 10mg/Kg de l'épirubicine a été effectuée selon le poids corporel de chaque animal (Annexe I).

Le méthotrexate est une poudre de 500 mg diluée dans 5 ml d'eau distillée. La dose du médicament méthotrexate a été administrée selon le calcul de la surface corporelle des rats du lots 3 pour une dose de 25 mg /m² selon la loi de surface $S (m^2) = 0.1 P^{0.683} (Kg)$ (Annexe I).

I-1-3- Matériel de laboratoire :

Tous le matériel et les réactifs utilisés appartiennent au laboratoire de biochimie du département de biologie de l'université de Jijel.

Pour réaliser les différents tests du bilan hépatique, il est nécessaire d'avoir un matériel approprié.

- Matériel utilisé pour l'administration :

- Seringue
- médicament (épirubicine & méthotrexate)
- Cage de contention
- Alcool (l'éthanol)

- Matériel utilisé pour le prélèvement du sang et dissection :

- Tubs capillaires
- EDTA
- Tubs à hémolyse
- Plaque et épingles

- Matériel utilisé pour la séparation du sang et de la fraction cytosolique :

Centrifugeuse (sigma 6k 15 ; Bio block scientific) centrifugeuse 55702 6000/min

- Tubes à hémolyse
- Epindorf
- Micropipette

- Matériel utilisé pour les dosages et les mesures :

- Spectrophotomètre UV min 1240. UV- vis spectrophotomètre SHIMADZU
- Tube à essai
- Pipette et pipeur
- Bain mari
- Votrex

Pour la pesée des organes : une balance de précision.

I-2- Méthodes :

L'exploration de la toxicité hépatique par les médicaments anticancéreux a nécessité l'analyse de plusieurs paramètres sanguins et cytosoliques.

I-2-1- Les prélèvements sanguins

Le prélèvement de sang à partir de la veine retro-orbitale (fig 1), le sang est récolté dans des tubes à hémolyse contenant de l'EDTA

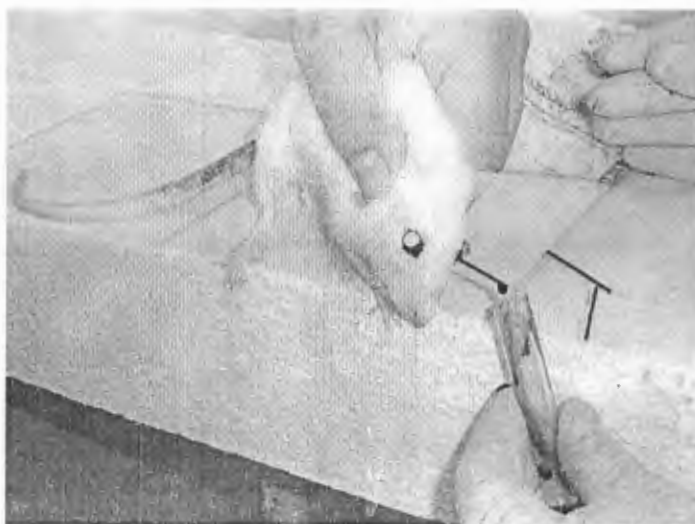


Figure 1 : prélèvement du sang à partir de la veine retro-orbitale.

Le sacrifice des rats (fig 2) a été effectué chaque semaine après l'administration, donc deux rats ont été sacrifiés chaque semaine :

1 témoin et 1 traité suivant le tableau I ci-dessous :

Tableau I : Poids des foies et poids corporels des rats sacrifiés

Semaine	1 ^{er} Semaine			2 ^{ème} Semaine		3 ^{ème} Semaine		4 ^{ème} Semaine	
Rats	T4	R1	R10	T1	R5	T2	R4	T5	R2
Poids des Rats (g)	120.5	141	79.5	122.6	114.4	143.5	164	190	151
Poids de foie (g).	5.63	6.38	4.75	6.07	6.62	5.81	6.85	8.97	5.37

I-2-2- Le prélèvement du foie :

Le prélèvement du foie a été effectué après la dissection des animaux (fig. 2).



Figure 2 : Dissection du rat et prélèvement du foie

I-2-3- Exploration biochimique :

L'exploration de l'hépatotoxicité inhérent à l'administration des différents médicaments a été effectuée suivant un certain nombre de mesures enzymatiques (SOD, catalase, glutathion, TGP et TGO).

a- Extraction de la fraction cytosolique :

Les mesures des activités enzymatique de SOD et de catalase s'effectués sur le cytosol des hépatocytes, une extraction de ce cytosol est réalisée suivant le protocole :

Le foie prélevé est fragmenté en des parties de 1g pour chacun. 1g du foie est broyé dans 3ml de KCl 1,17%, et séparé dans 2 tubes à hémolyse.

Une première centrifugation à 800 rpm pendant 15 minutes à 4°C permet de prélever le surnageant. Ce dernier est récupéré dans des épinndorf et recentrifugé à 9600 rpm pendant 45 minutes à 4°C. Le deuxième surnageant est la fraction cytosolique.

La mesure de l'activité enzymatique du glutathion s'effectuant sur le cytosol des hépatocyte qui est extrait suivant le protocole :

Le broyage de 1g de foie dans 3ml TCA 5%. L'homogénat est divisé en deux tubes à hémolyse. la centrifugation à 200 tours/min pendant 10 minutes permet de récupérer le surnageant qui représente la fraction cytosolique.

b- Dosage des Protéines Cytosolique : (méthode de Lowry, 1953)

Le dosage des protéines cytosoliques a été réalisé avant les mesures des activités enzymatiques à partir de la fraction cytosolique extraite dans le KCl, le dosage se fait suivant les tableaux II et III ci-dessous.

- Mélange réactionnel :**Tableau II : composition du mélange réactionnel.**

réactif	Volume	
Fraction cytosolique	5 µL	
Tampon TS (PH 7.2° Q.S.P 500 ml	45 µL	Tris 0.06g Sucrose 42.8g

Le pH du tampon est réglé à 7,2 à 4°C

- Mode opération :**Tableau III : Dosage des protéines cytosoliques**

Essai	mélange réactionnel	5 µL
	NaCl 9%	1.98 µL
Blanc	tampon TS	20 µL
	NaCl 9%	1.98 µL

La préparation est répétée trois fois.

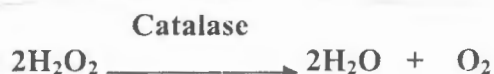
La lecture de la densité optique à 340 nm est convertie en concentration

Le dosage de la concentration des protéines cytosoliques est calculé selon la formule :

$$\frac{Do \text{ moyenne} \times 1000}{0.0096} \times \frac{1}{1000} = [] \text{ mg/ml}$$

B - c- Activité de la catalase : (méthode de Claiborne, 1985)**Principe :-**

La détermination de l'activité de la catalase dépend du changement d'absorbance résultant de la décomposition de H₂O₂ par la catalase :



Cette variation est mesurée à 240 nm

La mesure est fait suivant les tableaux IV et V

Produits chimiques :

- K_2HPO_4
- KH_2PO_4
- H_2O_2 30%

Réactifs :

Tableau IV : Réactifs utilisé pour la mesure de l'activité de la catalase :

tampon phosphate de potassium	0.1M
H_2O_2 30%	19 μ mol

-Mode opération :

1- Préparation de phosphate de potassium (0.1 M, pH 7.4)

14.98g de K_2HPO_4 dilué dans 100 ml d'eau distillée

Le pH ajusté à 7.4 par une solution de 13g de KH_2PO_4 dilué dans 100 ml de l'eau distillé.

2- préparation de H_2O_2 30% dans tampon phosphate.

1M \longrightarrow 30 ml H_2O_2

1m mol \longrightarrow X_1

$$X_1 = 0.03ml$$

1m mol \longrightarrow 0.03 ml H_2O_2

19 m mol \longrightarrow X_2

$$X_2 = 0.57ml$$

Le volume 0.57 ml d' H_2O_2 30% complété à 100 ml par le tampon phosphate de potassium (PH 7.4)

3- Mesure de l'activité de la Catalase :

Tableau V : Mesure de l'activité de la catalase :

solution H_2O_2 préparé dans le tampon	2.9 μ L
fraction cytosolique	100 μ L

Lire la densité optique à 240 nm chaque minute pendant 3 minutes

L'activité enzymatique est exprimée en unité/mg de protéine (annexe 3), l'unité de l'activité de la catalase est calculée aussi ;

$$F = 2.303/T \log A1/A2$$

$$U/mg.prot = F/mg.prot$$

T : intervalle de temps

A1 : Absorbance à t=0

A2 : Absorbance à t=1mi

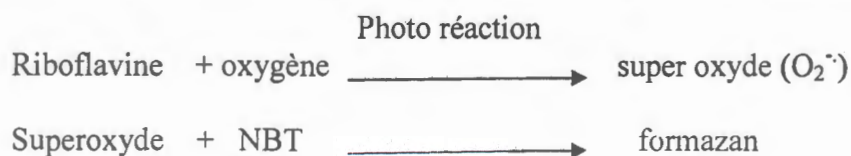
(Claiborne, 1985).

d- L'activité de la SOD : (méthode de Beauchamp & Fridovich, 1971)

La méthode enzymatique est réalisée avec le principe suivant :

- Principe :

La détermination de l'activité dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitroblutetrazolium [NBT] inhibition de la formation de formazan par les superoxydes qui sont produit par la réaction de la riboflavine et l'oxygène photo réduite :



La mesure s'est faite suivant les tableau VI et VII ci- dessous

Tableau VI : Composition du réactif de travail

solution	Volume (ml)	concentration (M)
Cyanide de sodium	0,1	2×10^{-5}
Méthionine	1	10^{-2}
EDTA	1	6.6×10^{-3}
NBT	0,1	$1,67 \times 10^{-4}$
Riboflavine	0,1	2×10^{-6}

-Mode opératoire:

Tableau VII : Mesure de l'activité de la SOD.

réactif de travail	2 μ L
fraction cytosolique	5 μ L

Le mélange est irradié par lumière blanche pendant 10 minute dans une boîte en métal de dimensions 60cm x 15cm x 20cm.

Le blanc est préparé dans les mêmes conditions en l'absence de la fraction cytosolique.

La densité optique DO est mesurée à 560 nm utilisant un spectrophotomètre (Beauchamp & Fridovich, 1971).

Une unité de l'activité de la SOD est calculée pour l'enzyme causant 50% d'inhibition de la réduction du formazan.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Abs du blanc} - \text{Abs d'échantillon}}{\text{Abs du blanc}} \times 100$$

$$\text{SOD unité/ml} = \% \text{ inhibition} \times 6,35 \quad (\text{Beauchamp \& Fridovich, 1971}).$$

e- Dosage de la glutathion cytosolique: (méthode d'Elman, 1959)

La détermination de l'activité du GSH-Px dépend du changement d'absorbance résultant de l'oxydation du NADPH en NADP.

La mesure est réalisée suivant les tableaux VIII et IX

- Réactif de travail :

Tableau VIII : Composition de réactif de travail

fraction cytosolique	50 μ L
tampon phosphate monosodique PH = 8, 0.1M	10 μ L

- Mode opératoire

Tableau IX: mesure de l'activité de la glutathion.

Essai	Réactif de travail	3 μ L
	DTNB	20 μ L
Blanc	TCA 5%	3 μ L
	DTNB	20 μ L

La densité optique est mesurée après 5 min à 412 nm (Elman, 1959)

f - Mesure de l'activité de la TGP :(Kit Biosystem)

- Principe :



LDH : Lactate déshydrogénase

La concentration catalytique est déterminée en utilisant la réaction couplée de LDH, à partir de la vitesse de disparition du NADH, une mesure à 340 nm.

La mesure de l'activité s'effectue suivant les tableaux X et XI ci-dessous

-Composition des Réactifs :

Tableaux X : réactifs utilisés pour la mesure de l'activité de la TGP :

Réactifs	composition	concentration
Réactif A	tris PH 7.3	150m mol/L
	L- alanine	750 m mol/L
	LDH	1350 U/L
Réactif B	NADH	1.3 m mol/L
	2-oxoglutarate	75 m mol/L
	Hydroxyde de sodium	148 m mol/L
	sodium azide	9.5 g/L

Le réactif de travail est un mélange de 4 volumes de réactif A avec 1 volume de réactif B

- Mode opératoire**Tableau XI : mesure de l'activité de la TGP**

.réactif de travail	1 µL
Echantillon	5 µL

Mélangé est lire la densité optique (DO) pendant 3 minute sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 340 nm, après 1 minute d'incubation à 37°C.

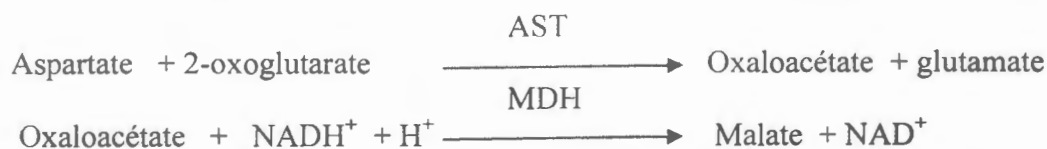
La concentration de la TGP dans l'échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$\Delta A / \text{min} \times 3333 = \text{U/L.}$$

$\Delta A / \text{min}$: est l'accroissement moyen d'absorbance par minute.

g -L'activité de la TGO: (Kit Biosystem)

La méthode enzymatique est réalisée avec le principe suivant :

- Principe :

MDH : Malate déshydrogénase

La concentration catalytique est déterminé en utilisant la réaction couplée de MDH, à partir de la vitesse de disparition du NADH mesuré à 340 nm (Gella *et al.*, 1985 ; Approved recommandation on IFCC, 1986 ; Socieda Espanola de Quimica Clinica, 1987).

La mesure s'effectué suivant les tableaux XII et XII ci- dessous

- Composition des réactifs :

Tableau XII : réactifs utilisés pour la mesure de l'activité de la TGO :

Réactifs	composition	concentration
Réactif A	tris PH 7.8	121 m mol/L
	L- aspartate	362 m mol/L
	MDH	> 460 U/L
	LDH	> 660 U/L
	Hydroxyde de sodium	255 m mol/L
Réactif B	NADH	1.3 m mol/L
	2-xoglutarate	75 m mol/L
	Hydroxyde de sodium	148 m mol/L
	sodium azide	9.5 g/L

Le réactif de travail est un mélange de 4 volumes de réactif A avec 1 volume de réactif B

- Mode opératoire

Tableau XIII : mesure de l'activité de la TGO

.réactif de travail	1 μ L
Echantillon	50 μ L

Mélanger et lire la densité optique pendant 3 minutes sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 340 nm, après 1 minute d'incubation à 37°C.

La concentration du TGO dans l'échantillon est calculée à partir de la formule suivante
 $\Delta A / \text{min} \times 3333 = \text{U/L}$.

$\Delta A / \text{min}$: l'accroissement moyen d'absorbance par minute.

chapitre II

Résultats

- *Surveillances Pondérales et Alimentaire des Animaux*
- *Résultats du Dosage Protéique et les Mesures des Activités des Enzymes cytosoliques*
- *Résultats des Activités Enzymatiques Sanguines*

II- RESULTATS ET INTERPRETATIONS :

Après administration de la dose d'épirubicine un rat du lot 2 est mort une semaine après. Soit 20% mortalité d'autre part dans la même semaine et après le 1^{er} sacrifice les 4 rats du lot 3 sont mort soit un taux de mortalité de 100% pour le lot 3.

Il a été impossible de récupérer les organes de ces rats puisqu'il n'y a pas accès à l'animalerie pendant le week-end.

II-1- Surveillances Pondérales et Alimentaire des Animaux

Le foie de chaque rat est pesé après sacrifice, les poids du foie sont donnés dans le tableau XV suivant :

Tableau XV : Poids des foies et poids corporels des rats sacrifiés

Rats	1 ^{ère} semaine			2 ^{ème} semaine		3 ^{ème} semaine		4 ^{ème} semaine	
	T4	R1	R10	T1	R5	T2	R4	T5	R2
poids de rats (g)	120.5	141	79.5	122.6	114.4	143.5	164	190	151
poids de foie (g)	5.63	6.38	4.75	6.07	6.62	5.81	6.88	8.97	5.37
Rapport poids du foie / poids corporel	0,046	0,048	0,059	0,049	0,057	0,040	0,041	0,047	0,035

Tableau XVI : Moyennes des Pesées Quotidiennes des Animaux(g)

	1 ^{ère} semaine	2 ^{ème} semaine	3 ^{ème} semaine	4 ^{ème} semaine
\bar{X} lot témoin	79.80 ±7.99	100.7 ±2.61	139.25 ±5.48	181.45 ±3.15
\bar{X} lot Traité 2	129.35 ±14.73	129.35 ±13.69	152 ±2	149.16 ±5.08
\bar{X} lot Traité 3	88.42 ±4.03	-	-	-

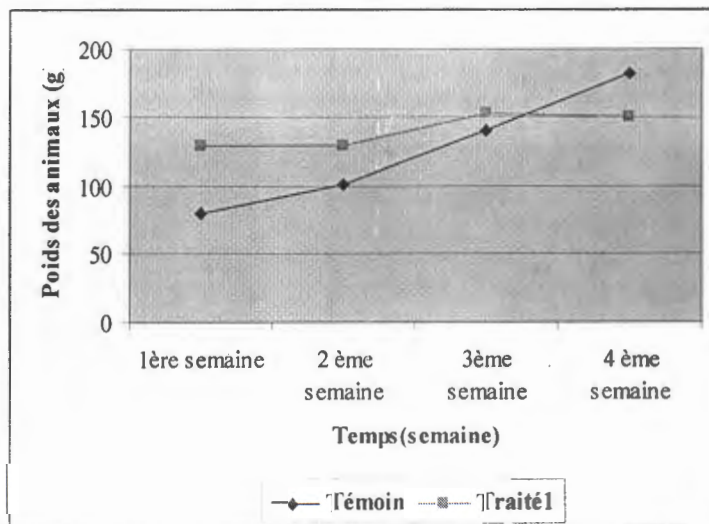


Figure 4 : Evolution des poids des rats au cours des semaines de l'étude.

La figure 4 montre l'évolution des poids des rats témoins et traités au cours du temps. La croissance est plus rapide chez les témoins que chez les traités, soit un taux de croissance plus élevé chez les témoins par rapport aux traités sur un mois d'étude.

Le tableau XVII ci-dessous donne les quantités d'aliment consommé chaque semaine pour le lot témoin et traité :

Tableau XVII : Quantités (g) d'aliment consommé dans chaque lot

	1 ^{ère} semaine	2 ^{ème} semaine	3 ^{ème} semaine	4 ^{ème} semaine
Témoin	12,17 ±1.32	11,37 ±2.52	17,13 ±2.97	18,9 ±2.25
Traité 1	7,87 ±1.29	13,26 ±3.56	11,38 ±2.04	8,27 ±5.27

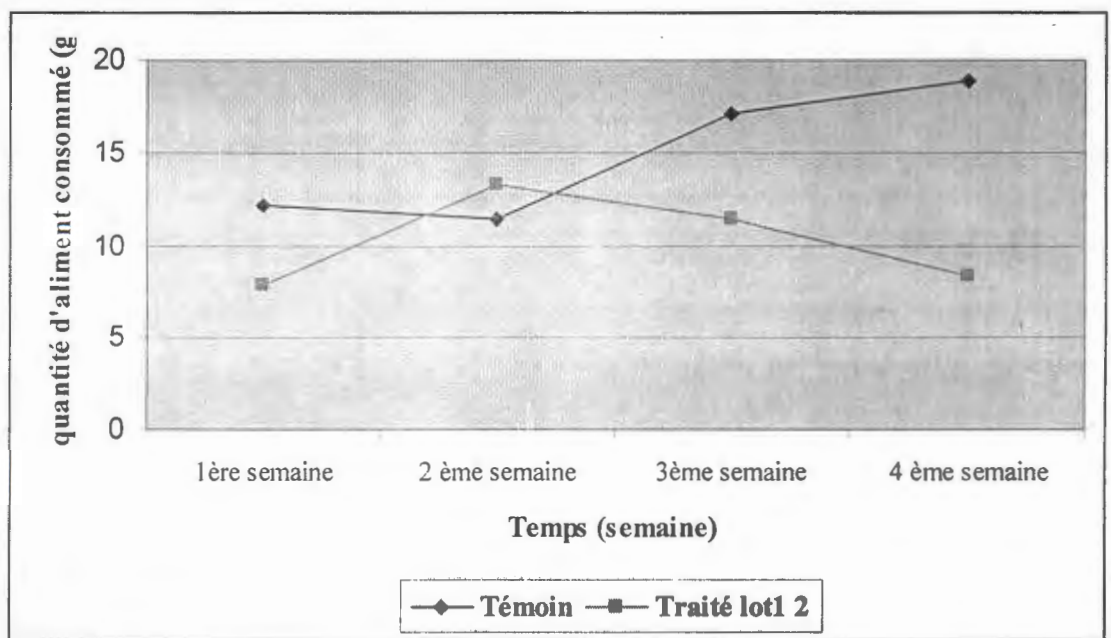


Figure 5: Evolution de la quantité d'aliment consommé par les rats témoins et traités au cours du temps

La consommation des aliments étant plus grande chez les animaux du lot témoin, une augmentation de cette consommation est cependant observée pendant la deuxième semaine chez le lot traité (fig. 5).

II-2- Résultats du Dosage Protéique et les Mesures des Activités des Enzymes cytosoliques :

II-2-1 Dosage des Protéines Cytosoliques:

Les résultats du dosage des protéines cytosoliques à partir de la fraction cytosolique hépatocytaire (fig.6) sont répertoriés dans le tableau XVIII suivant :

Tableau XVIII : Résultats du Dosage des Protéines Cytosoliques (mg/ml).

	1 ^{ère} Semaine	2 ^{ème} Semaine	3 ^{ème} semaine	4 ^{ème} semaine
Témoins	5.47	10.20	7.18	20.41
Lot Traités 1	6	17.18	8.43	18.22
Lot Traités 2	1,66	-	-	-

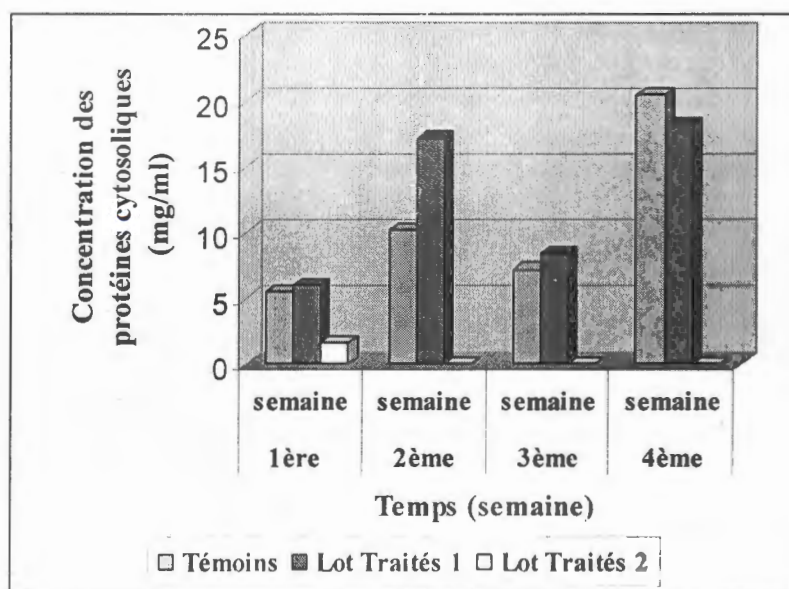


Figure 6: Variations de la concentration des protéines cytosolique chez les animaux témoins et traités.

La figure 6 ci-dessus montre les variations des concentrations des protéines cytosoliques chez les rats témoins et traités. Une augmentation de ces taux est relevée chez environ 75% des rats traités par l'épirubicine au 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} sacrifice soit après 1, 2 et 3 semaines de traitement. Par contre une diminution de ce taux est relevée à la 4^{ème} semaine.

Le traitement par le méthotrexate a provoqué une diminution de la concentration cytosolique des protéines après une semaine.

II-2-2- Mesure de l'Activité de la Catalase :

Les résultats de la mesure de l'activité de la catalase (fig.7) sont répertoriés dans le tableau XIX :

Tableau XIX : Résultats de l'activité de la catalase

Activité de la catalase (UI)	Témoins	Lot Traité (1)	Lot Traité (2)
1 ^{ère} Semaine	0,099	0,197	0,059
2 ^{ème} Semaine	0,236	0,316	
3 ^{ème} Semaine	0,344	0,494	
4 ^{ème} Semaine	0,218	0,362	

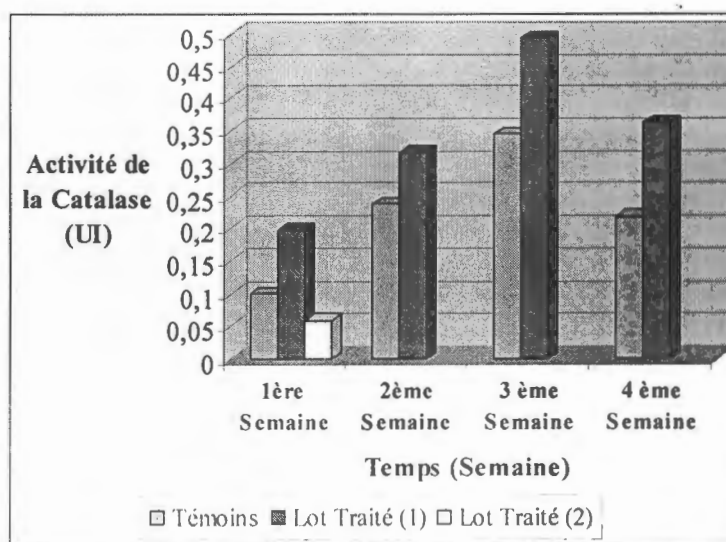


Figure 7 : Variations de l'Activité de la Catalase dans le cytosol Hépatique entre témoins et traités

La figure 7 montre les variations de l'activité enzymatique de la catalase chez les témoins et les traités. Une augmentation de cette activité est relevée chez tous les animaux traités pour le lot 2 après 1, 2, 3 et 4 semaines de traitement. Une diminution d'environ 40% de cette activité est cependant remarquée chez le rat du lot 3 par rapport au témoin du 1^{er} sacrifice soit après une semaine de traitement (associant deux médicaments).

II-2-3- Mesure de l'Activité de la SOD

Les résultats obtenus de la mesure de l'activité de la SOD (fig.8) sont répertoriés dans le tableau XX ci-dessous :

Tableau XX : Résultats de l'activité de la SOD

	Témoins	Traités (lot1)	Traités (lot2)
1 ^{ère} Semaine	95,25	97,79	165,1
2 ^{ème} Semaine	232,41	242,47	-
3 ^{ème} Semaine	174,62	213,36	-
4 ^{ème} Semaine	146	184,15	-

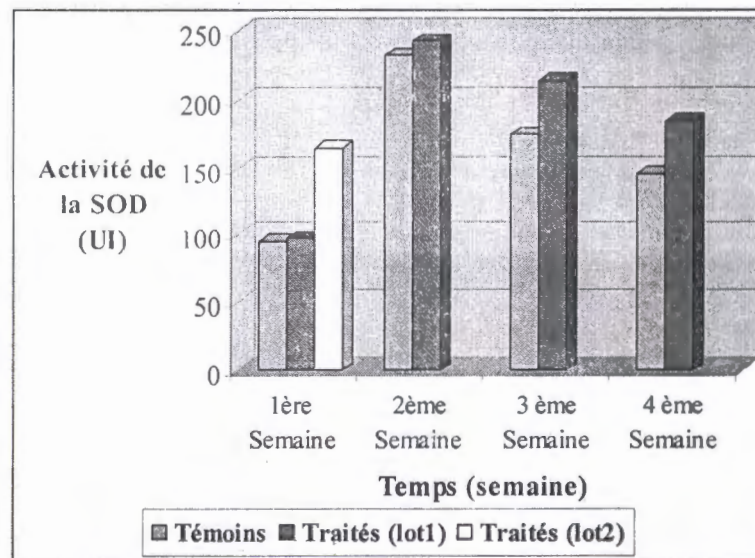


Figure 8 : Variations de l'activité de la SOD entre les rats témoins et traités

Les résultats affichés dans la figure 8 montrent les variations de l'activité enzymatique de la SOD chez les témoins et les traités. Une augmentation de cette activité est relevée chez tous les animaux traités pour le lot 2 soit après 1, 2, 3 et 4 semaines de traitement. L'augmentation de cette activité est de presque 42,69% relevée chez le rat du lot 3 contre seulement 2,59% pour celle du rat du lot 2 au 1^{er} sacrifice soit après une semaine de traitement. L'activité de la SOD reste augmentée chez les traités par rapport aux témoins pour la 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} semaine de traitement.

II-2-Dosage du Glutathion cytosolique:

a- Courbe d'étalonnage GSH

L'activité de la glutathion a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage (fig. 9) qui est réalisée selon le tableau XXI.

Tableau XXI : Résultats de DO de la courbe d'étalonnage de la GSH

(GSH) (mM)	40	20	10	05	02.5	01.25
DO	1.251	1.089	0.557	0.217	0.058	0.060

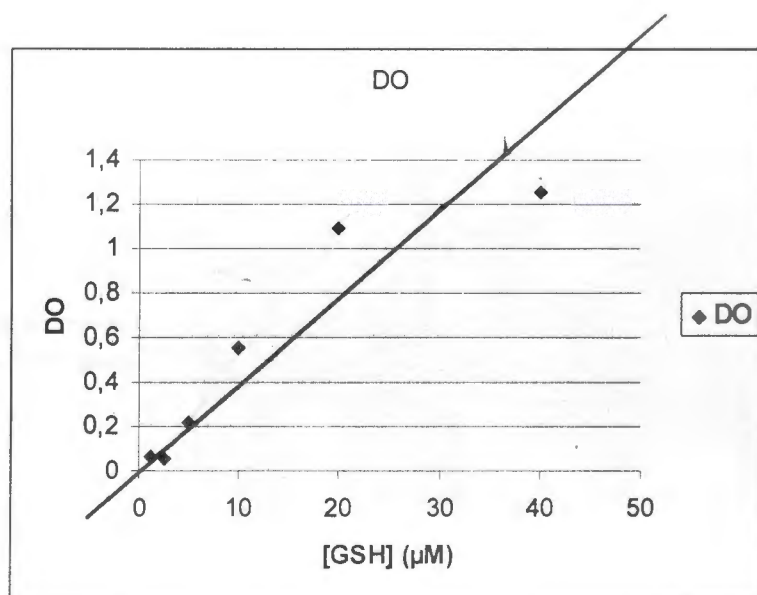


Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la GSH

b- Dosage de GSH

Les résultats d'investigation des paramètres biochimiques et enzymatiques plasmatiques chez les rats témoins et traités sont rapportés comme suit :

II-3-1- Activité de la TGP :

L'activité de la TGP (fig.11) pour les rats témoins et traités est donnée dans le tableau XXIII ci-dessous :

Tableau XXIII : Résultats de l'activité de la TGP (U/l)

	1 ^{ère} semaine	2 ^{ème} semaine	3 ^{ème} semaine	4 ^{ème} semaine
Témoins	27,77 ±6,84	141,64 ±52,99	36,36 ±33,45	86,65 ±46,66
Traités 1	33,32 ±19,62	117,76 ±53,46	151,65 ±118,32	249,97 ±38,90
Traités 2	53,32	-	-	-

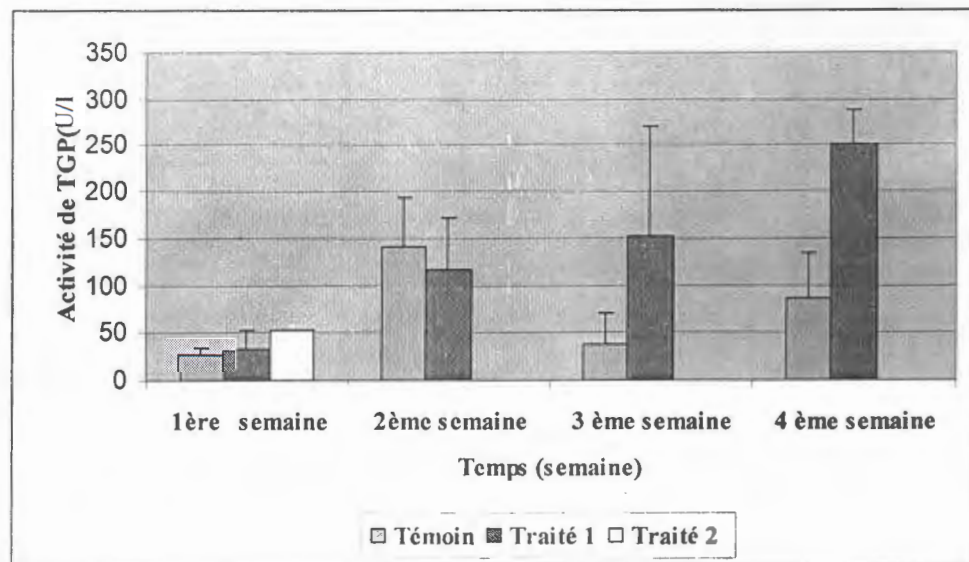


Figure 11: Variations de l'Activité de la TGP entre Témoins et Traités

La figure 11 montre les variations de l'activité de la TGP chez les rats témoins et traités. Une augmentation de ces taux est relevée chez environ 75% des rats traités du lot 2 soit après 1, 3 et 4 semaines de traitement, la plus remarquable étant d'environ 65,33% à la 3^{ème} semaine. De même pour le lot 3, une augmentation de l'activité est observée après une semaine de traitement.

chapitre III

Discussions

III-DISCUSSION

L'étude de l'hépatotoxicité a été réalisée sur des rats Albinos de souche *wistar* (*Ratus rattus*). Ces rats sont répartis en 3 lots chacun contenant 5 rats :

Un lot témoin ; un lot traité par l'épirubicine (10mg/kg) et un lot traité par une association de deux médicaments, épirubicine et méthotrexate avec les doses : 10mg/Kg en dose unique et 25mg/m² en deux doses, respectivement. Les deux médicaments ont été administrés par voie directe (intraveineuse) au niveau de la veine caudale.

L'étude de toxicité s'est étalée sur un mois. Nous avons programmé des sacrifices des animaux à un intervalle de 7 jours après l'administration.

Les prélèvements sanguins ont été effectués pour tous les rats chaque semaine.

Après administration de la dose d'épirubicine un rat du lot 2 est mort une semaine après. Soit 20% mortalité. D'autre part, après administration de la deuxième dose de méthotrexate, les 4 rats du lot 3 sont mort soit un taux de mortalité de 100% pour le lot 3. Ce taux de mortalité s'explique par une non tolérance de la dose administrée qui pourrait atteindre la DL100.

Les rats des différents lots ont été pesés avant les traitements (tab14) et quotidiennement après l'administration des médicaments. Les moyennes des poids corporels dans chaque lot (tab 16, fig4) montrent une croissance plus rapide dans le lot témoin contre une croissance relativement lente dans le lot traité. Cette diminution du taux de croissance est relative à une anorexie chez les animaux du lot traité par l'épirubicine (tab 17, fig5). Le rapport : poids du foie / poids corporel pour les rats traités est supérieur à celui des rats témoins dans les 3 premières semaines exprimant des atteintes hépatiques tissulaires.

L'exploration de la fonction hépatique chez les animaux témoins et traités s'est limitée à des mesures d'activités enzymatiques cytosoliques et sériques.

Les résultats du dosage de protéines cytosoliques (tab 18, fig6) montrent une nette augmentation chez les animaux traités expliquant une forte production enzymatique due à la présence quantitatives de métabolites pouvant s'agir des substrats éventuels.

Des études montrent que la toxicité hépatique induite par les anticancéreux tel que le méthotrexate (intoxication aiguë et chronique) est associée à un stress oxydatif, caractérisé par une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène et de produits dérivant de lipides membranaires endommagés (Berthoin, 2000)

Pour protéger ses tissus contre toute agression radicalaire, l'organisme humain possède des systèmes enzymatiques, tels que les superoxydes dismutases et la catalase qui jouent un rôle de protection, ainsi que les glutathion-peroxydases (GSH-Px) qui jouent un rôle de détoxification (Avisar *et al.*, 1989)

La SOD / Mn (mitochondriale) et la SOD / Cu-Zn (cytosolique) catalysent la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et O_2 . Les résultats de l'activité de la SOD cytosolique (tab. 20, fig. 8) ont montrés une augmentation chez tous les animaux traités soit un pourcentage de 100% pour le lot 2 et ceci après 1, 2, 3 et 4 semaines de traitement. Mais cette augmentation est plus importante (42,69%) chez le rat ayant reçu l'association des deux médicaments contre seulement 2,59% pour celle du rat recevant l'épirubicine seulement, après une semaine de traitement. L'activation des SOD Cu-Zn (cytosolique) pourrait être un premier mécanisme de défense contre l'effet des anions superoxyde sur la mitochondrie et autres organites cellulaires (Berthoin, 2000).

Catalase et glutathion peroxydase sont les principales enzymes impliquées dans la réduction de H_2O_2 en H_2O . La glutathion réductase permet la régénération du glutathion oxydé (GSSG) sous forme réduite. La glutathion S-transférase catalyse la conjugaison de substrats électrophiles et des xénobiotiques avec le glutathion.

L'activité de la catalase présente une augmentation chez les animaux traités au cours des quatre semaines de l'étude elle est environ 1 à 2 fois supérieur chez les traités par rapport les témoins (tab 19, fig7). Cette activation de la catalase est forcément due à une forte production de peroxyde d'hydrogène principal substrat de la catalase (Marfak, 2003) relative à un stress oxydatif induit par les médicaments administrés.

Le rôle important joué par le glutathion dans la détoxification des espèces hautement réactives de l'oxygène n'est pas remis en cause (Meister & Anderson, 1984) Non seulement celui-ci réagit de manière covalente avec les ROS mais il sert aussi de substrat pour les enzymes GSH-Px et GST impliquées dans le relargage de peroxyde d'hydrogène et des produits toxiques de la peroxydation lipidique.

Les résultats du dosage du glutathion effectué dans la fraction cytosolique du foie (tab. 22, fig10) à révélé une diminution des taux tous animaux traités par l'épirubicine soit un taux de 100% par rapport aux témoins.

La déplétion du pool cellulaire de glutathion peut être due à un ou plusieurs des éléments suivants :

- perturbation de la synthèse de glutathion,
- augmentation de l'efflux de celui-ci ou augmentation de son utilisation pour éliminer les espèces réactives de l'oxygène et produites venant des lipides endommagés

Une augmentation d'environ 27,77 % du taux de glutathion est cependant relevée chez le rat recevant une association deux médicaments (Berthoin, 2000).

Dans le foie adulte, la maintenance d'un pool cellulaire de glutathion est un processus ATP-dépendant et la déplétion de glutathion reflète une atteinte des fonctions mitochondriales (Berthoin, 2000).

Des études ont montré qu'une déplétion de la synthèse d'ATP par la cocaïne par exemple est une raison pour compromettre l'habilité des cellules à maintenir l'homéostasie du glutathion (le transport du glutathion dans la mitochondrie est un processus ATP-dépendant ; ainsi la déplétion du GSH mitochondrial peut aussi être attribuée à une déplétion de l'ATP cellulaire chez les rats exposés à la cocaïne) (Berthoin, 2000).

Le dommage hépatique pourrait être initié à ce stade, plus spécialement quand les enzymes ultérieures de protection, c'est-à-dire catalase, glutathion peroxydase et glutathion-S-transferase, ne fonctionnent plus en séquence. Comme indiqué par Devi et Chan (Devi et Chan, 1996). Lorsque les SOD / Mn et Cu-Zn augmentent avec une croissance concomitante de la catalase et de la glutathion peroxydase, une quantité significative de peroxyde d'hydrogène générée dans la mitochondrie et le cytoplasme pourrait initier une suite de réactions cytotoxiques

en produisant des espèces réactives de l'oxygène. Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent réagir avec les membranes biologiques, particulièrement avec des acides gras polyinsaturés, endommageant les mitochondries et d'autres organites cellulaires avec perte de l'intégrité fonctionnelle (Berthoin, 2000).

L'étude du système de défense antioxydant dans le cadre d'une hépatotoxicité induite par les médicaments anticancéreux est important parce qu'il peut contribuer à la compréhension des mécanismes responsables du dommage hépatique et présenter des indications pour des interventions thérapeutiques (diététiques ou pharmacologiques) afin de limiter les dommages hépatiques et avant que ceux-ci ne deviennent irréversibles.

L'exploration biochimique de la fonction hépatique chez les animaux témoins et traités s'est limité aux mesures des activités des transaminases sériques :

Les résultats de l'activité de la TGP (tab 23, fig. 11) optent pour une augmentation la 1^{ère}, 3^{ème} et 4^{ème} semaine de l'étude ainsi que pour le rat traité par l'épirubicine du lot 3 (association des médicaments). Quant à l'activité de la TGO (tab 24, fig. 12), elle montre également une augmentation plus importante à la 3^{ème} semaine du traitement. Une telle hypertransaminasémie a été observée chez des patients traité par le CCNU (1-(2-chloroéthyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosuré) un anticancéreux (Viotte *et al.*, 1986)

Du fait de leur localisation au niveau du foie la concentration plasmiqme de la TGO et plus élevée que celle de la TGP, en cas d'une cytolysse hépatique est subit une libération du contenu cellulaire, essentiellement les aminotransférases, dans le sang avec un taux de TGP inférieur à celui de TGO, cela signifie que les lésions cellulaires sont encore discrètes avec seulement une libération des enzymes cytoplasmiques et particulièrement la TGO.

CONCLUSION

CONCLUSION

La chimiothérapie anticancéreuse impose l'utilisation de certains médicaments ayant parfois des effets toxiques pouvant induire des altérations fonctionnelles et structurales dans l'organisme.

La toxicité de ces substances chimiques xénobiotiques est à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés. La libération excessive de radicaux libres oxygénés au cours de ce type de traitement stimule la fonction des enzymes de détoxification hépatiques.

L'étude de la toxicité hépatique induite par l'administration de deux médicaments anticancéreux : épirubicine et méthotrexate chez des rats albinos *wistar* a conduit aux résultats suivants :

- une augmentation des activités enzymatiques de la SOD, Catalase et glutathion cytosoliques du foie.
- Une augmentation des activités des transaminases (TGO et TGP) sériques.

Ces résultats traduisent une atteinte hépatique résultant d'une toxicité médicamenteuse.

Références Bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Awadhi A., Dale P. & Makendy R.J., Pancytopenia associated with low dose methotrexate therapy. Aregional survery. J Rheumatol ,(1993), 20: 1121-1125.
- Approved Recommendation (1985) on IFCC Methods for the measurement of catalytic Concentration of Enzymes.Part 2: IFCC Method for Aspartate Aminotransferase(EC2.6.1.1).J Clin Chem Clin Biochem, (1986) ;24 :497-510. In BioSystem REAGENTS&INSTRUMENTS
- Aproved Recommendation(1985) on IFCC. Methods for the measurement of catalytic Concentration of Enzymes.Part 3 :IFCC Methode for Alanine Aminotransferase(EC2.6.1.2).J Clin Chem Clin Biochem ,(1986) ;24 :481-495 .In BioSysteme REAGENTS&INSTRUMENTS
- Arms & Karem, Biologie Tome1, Montréal, edition études viriant ,(1989).
- Arnaud J., Chapuis P., Jandon M.C. & Bellanger J., Marqueurs biologiques nutritionnels des carences en zinc, cuivre et sélénium. Ann .Biol, (1993) ,51 : 589-604
- Avissar N., Whitin J.C., Allen P.Z. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *j.biol. chem.* (1989), 2 : 15850-15855, In Milane H. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat en sciences. Université louis pasteur. P :18
- Becouarn Y., Cancérologie et hématologie, (1993) ,8 :64-65-41
- Benhamou., Foie pancréas, voie biliaire, 3ème edition française flamarion médecine science, (1980)
- Benhemou JP., Maladies du foie et voies biliaires. Chapitre2à9, 4^{ème} édition médecine flamarion, (2000).
- Bentué-Ferrer D., Pharmacologie des Anticancéreux (Hormonothérapie incluse) Classification. mode d'action, principaux effets indésirables (2001-2002).
- Berthoin K. Thèse de Doctorat. Etude de la toxicité hépatique de la cocaïne associée a de l'alcool effets de l'éthanol sur le métabolisme de la cocaïne dans les hépatocytes de rat en suspension et dans un modèle enzymatique humain (2000), 10.
- Boreal J., Comment prescrire et interpreter un examen de biochimie, 2eme edition Maloine, (1984), 700-703
- Boueris A.,&Chance, the mitochondriol generation of hydrogen peroxide, General propertie and effect of hyperboric oxygen, Biochimie J.(1973),134 ,707,710
- Bournérais I & Chosidow O., Méthotrexate et psoriasis pharmacologie et pris en charge théapeutique. Ann Dermatol Veppéréol, (1994), 121:69-74.
- Brambilla C., Rossi A., Bonfante V., Ferrari L., Villani F., Crippa F & Bonadonna G., phase II study of doxorubicin versus epirupicin in advance breast. Cancer treat Rep (1986). 70:2:261-266.

- Chance B.**, Sies H. & Boueris A., Hydroperoxide metabolism organs, *Physiol Rev*, (1979), 59,527,605.
- CD Anatomie.**, Thésaurus médical informatique
- Christine C.**, Foie et toxine d'origine professionnelles, Internet en médecine de rasbourg, (1999)
- Christmann D.**, Epirubicin in der kombinations-chemotherapie des metastasierenden mammarkarzinoms (VEC) and for tageschrittenen ovarialkarzinoms (PEC) .*Onkologie* (1986), 9:1: 11-12.
- Cino M., & Del Mastro R.**, generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following post de copitative ischemia, *Arch Biochem Biophys* (1989), 269:623,638
- Cookell AJ & Faulds D.**, Epirubicin. An Updated review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of breast cancer. *Drugs* (1997), 53:453-482.
- Coombes RC.**, Bliss JM & Wills J., Etat Adjuvant cyclophosphamide, méthotexate, and fluorouracil, Epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in premenopausal women, with axillary node positive operable breast cancer results of a randomized .*J Clin Oncol.* (1996); 14:35-45.
- Cotten Y.**, Pharmacologie, 4ème édition Masson Paris, (1997).
- Cotin S.**, Thèse, Anatomie du foie, (1998), (www.sopinra.fr/epidaure/formercollaborations/aijim/simulateur/annexeC.html)
- Crooke ST.**, Duvernay VH., Galran L & Perstayko AW., Structure-activity relationship of antracyclines relative to effects on macromolecular syntheses .*Mol Pharmacol* (1978), 14:290-8.
- Dathon TP.**, Shertzer HG & Puga A., Regulation of gene expression by reactive oxygen signaling, (2002), 14:879.
- Devi B.G. & Chan A.W.K.** Cocaine- induced peroxidative stress in rat liver: antioxidant enzymes and mitochondria. *J Pharmacol Exp Ther* (1996), 279 : 359-366, , In -Berthoin K. Thèse de Doctorat. Etude de la toxicité hépatique de la cocaïne associée à de l'alcool effets de l'éthanol sur le métabolisme de la cocaïne dans les hépatocytes de rat en suspension et dans un modèle enzymatique humain (2000), 10.
- Devulver B.**, Pathologie médicale. Paris, Masson Collection « Abrégés de médecine », (1998).
- Domart A.**, Larousse médical, entreprise nationale du Larousse. (1989) ,428-429
- Dorosz P.**, Guide pratique des médicaments, 23ème édition Maloine (2003), 1554-1555, 1610-1631
- Elaine N.**, Anatomie et physiologie Humaine, Marieb 2ème édition (1993), 796-802.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Awadhi A., Dale P. & Makendy R.J., Pancytopenia associated with low dose methotrexate therapy. A regional survey. *J Rheumatol*, (1993), **20**: 1121-1125.
- Approved Recommendation (1985) on IFCC Methods for the measurement of catalytic Concentration of Enzymes. Part 2: IFCC Method for Aspartate Aminotransferase (EC2.6.1.1). *J Clin Chem Clin Biochem*, (1986); **24**: 497-510. In BioSystem REAGENTS & INSTRUMENTS
- Approved Recommendation (1985) on IFCC. Methods for the measurement of catalytic Concentration of Enzymes. Part 3: IFCC Methode for Alanine Aminotransferase (EC2.6.1.2). *J Clin Chem Clin Biochem*, (1986); **24**: 481-495. In BioSysteme REAGENTS & INSTRUMENTS
- Arms & Karem, *Biologie Tome I*, Montréal, édition études viriant, (1989).
- Arnaud J., Chapuis P., Jandon M.C. & Bellanger J., Marqueurs biologiques nutritionnels des carences en zinc, cuivre et sélénium. *Ann Biol*, (1993), **51**: 589-604
- Avissar N., Whitin J.C., Allen P.Z. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. biol. chem.* (1989), **2**: 15850-15855, In Milane H. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat en sciences. Université Louis Pasteur. P: 18
- Becouarn Y., *Cancérologie et hématologie*, (1993), **8**: 64-65-41
- Benhamou., *Foie pancréas, voie biliaire*, 3ème édition française Flammarion médecine science, (1980)
- Benhemou JP., *Maladies du foie et voies biliaires. Chapitre 2 à 9*, 4^{ème} édition médecine Flammarion, (2000).
- Bentué-Ferrer D., *Pharmacologie des Anticancéreux (Hormonothérapie incluse) Classification. mode d'action, principaux effets indésirables* (2001-2002).
- Berthoin K. Thèse de Doctorat. Etude de la toxicité hépatique de la cocaïne associée à de l'alcool effets de l'éthanol sur le métabolisme de la cocaïne dans les hépatocytes de rat en suspension et dans un modèle enzymatique humain (2000), 10.
- Boreal J., *Comment prescrire et interpréter un examen de biochimie*, 2ème édition Maloine, (1984), 700-703
- Boueris A., & Chance, the mitochondrial generation of hydrogen peroxide, General properties and effect of hyperbaric oxygen, *Biochimie J.* (1973), **134**, 707, 710
- Bournérais I & Chosidow O., Méthotrexate et psoriasis pharmacologie et prise en charge thérapeutique. *Ann Dermatol Veneréol*, (1994), **121**: 69-74.
- Brambilla C., Rossi A., Bonfante V., Ferrari L., Villani F., Crippa F & Bonadonna G., phase II study of doxorubicin versus epirubicin in advanced breast. *Cancer treat Rep* (1986), **70**: 2: 261-266.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Elaine N.**, Biologie humaine, Anatomie et physiologie-Marieb 6ème édition américaine de Baek université, (1998), 419-437
- Fahn S & cohen G.**, the oxidant stress hypothesis in parkinson's disease evidance suparting it, Ann Nevrol, (1992), 32 : 804-814
- Favier A.**, L'actualité chimique. Mécanismes biochimiques. Le stress oxydant :Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique (2003): 109-111.
- Feld R., et al.**, Phase I-II study of high dose epirubicin in advanced non small-cell lung cancer. J Clin Oncol, (1992), 10(2): 297-303.
- "Foie" .**, Encyclopédie Microsoft (R), Ecorota99©(1993, 1998)
- Gella F J.,Olivella T.,Cruz Pastor M.,Arenas J.,Moreno R.,Durban R and Gomez JA.**Asimple procedure for routine determination of Aspartate aminotransferase and Alanin aminotransferase with pyrodixal phosphate.Clin.Chim Acta (1985); 153 :241-247. In BioSysteme REAGENTS&INSTRUMENTS
- Girroud JP., Mathé G & Meyniel G.**, Pharmacologie clinique expension scientifique Française (1988).
- Gonzales., R.**, Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxydase in red blood cells form patients with malignant diseases. Cancer Res, (1984), 44:4137-9.
- Gutterdige JM.**, Free Radicals in disease processus : acompliation of cause and cosequence. Free radicals connu, (1993), 19:141-158.
- Halliwell B.**, Free redicals antoxidants, and human disease, curiosity, cause or consequence honcet,(1994),344: 721-724
- Hil C & Doyon F.**, « La mortalité par cancer enfance » in médecine-science n°10Masson, (1997), 13 :1172 -1175
- Jadot G.**,les superoxyde dismutase:biochimie, pharmacologie. Thérapeutique, (1998).
- Jadot G .**, Antioxydants et vieillissement, paris. (1994) ,30-38,300
- Khayat D .**, protocoles de chimiotherpie anticancéreux et traitemnt des effets secondaires, (1999), 52-53,80-83
- Kinky N.**, Antroxydants function of corocteinoides, free red Biol, Med, (1989), 617
- Kruh J.**, Biochimie etudes médicales et biologiques et métabolismes herman collection, (1993)
- Lahouel M.**, La toxicologie hématologique, hépatique et rénale de deux medicament anticancerux (thèse de doctoura). (1985)
- Lamare J.**, Dictionnaire des termes de medecine. 24ème edition, (1995)

- Langlois I.; lepesle wils elisabeth . ; le coups humain ; (1998) 2^{ème} edition ; edition de bouk umiversité ; 327-339
- Lechat P., losier G, Ravveix B, Vinceurs M, & Webre S, Pharmacologie medical, 4ème edition mosson,(1993), 227-247
- Lechap P., Abrégé de pharmacologie medicale , Edition masson, (1995)
- Lechat P., Pharmacologie, pharmacocinétique et métabolisme des médicaments, service de pharmacologie clinique, (2005), 73.
- Le dictronaie VIDAL, 78ème edition ,(2002), 683-684
- Lippincott., Williams & Wilkins., The chemotherapy source book (3rd edition) .M.C.Perry, (2001).
- Lu F.C ., Toxicologie 2èmè edition masson, paris, (1991), 177
- Lu F.C ., .Toxicologie, Donnés générales, edition masson ,(1992)
- Malité M ., Madelaine I & Fauve P., Passage en ville des anticancéreux particularité et cas pratiques, (2004) :257.
- Marfak A., Thèse Radiolyse Gamma des Flavonoides. Etude des leur Reactivite avec les Radicaux Issus DesAlcools : Formation De Depsides ,(2003) ,2:10-11
- Mathovics B., *et al.*, Acomparative study of superoxide dismutase, catalase and lipide peroxidation in red blood cells form muscular dys trophy patients and normal controles. Clin Chem Acta (1982), 118:289-292.
- Meister A. & Anderson M.E. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52 : 711-760, 1983 IN -Berthoin K. Thèse de Doctorat. Etude de la toxicité hépatique de la cocaïne associée a de l'alcool effets de l'éthanol sur le métabolisme de la cocaïne dans les hépatocytes de rat en suspension et dans un modèle enzymatique humain (2000), 10.
- Morcian S. I, Bagotte JE.,Vaughn WH *et al.*, Supplementation with folic acid during methotrexate therayp for rheumatoid arthritis. *AnnIntern Med* ,(1994), 121 :833-841.
- Morel Y & Barouki R., Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*, (1999), 34: 481-496
- Myara J., Vieillissement et Stress Oxydant. Laboratoire de Biochimie, Hôpital Charles Foix (Ivry), (2002)
- Néve J.,Vertongen F., Peretz A & Corpentier YA., Voleurs usnelles du sélénium. et de la glutathion peroxydase dans une population belge. *Ann Biol Clin*, (1989),47:138-143.
- Novelli GP., Role of free radical in sentic shok. *J Physiol Pharmacol*, (1997), 48: 517-527.
- Pelmont J., Enzymes, Collection Grenoble sciences contrat N° : 13/11.09.(1993).

- Pearce HP & Branstein wilson B., Eroison of psoriatic plaques ; an ealysigin of methotrexate toxicity .J Am Acod Darmatol, (1996),35 :835-838.
- Pfizer Canada Inc. Monographie de PHARMORUBICIN PFS (chlorhydrate d'épirubicine injectable) (2005), 32.
- Pincemail J., Meurisse M. Limet R. & Defraigne J.O. Espèces oxygénées activées en médecine humaine : une approche didactique. Vaisseaux, Coeur, Poumons (1998), 3: 133-8.
- Polonovski M., Biochimie medical IV, 8^{ème} édition Masson Paris, (1971) ,444-454.
- Poupon R., Chignard N,Bardu V & Housset C.,La fonction biliaire et sa régulation. Editions médicales et scientifiques, (2004)20.
- Roeningk HH., Averbach R., Maibach H *et al.*, Methotrexate in psoriasis: consensus conference. J Am Acod Dermatol, (1998), 38: 478-485.
- Schorderet M et colloborateurs., Pharmacologie des concepts fondamentaux aux application théropentique édition office des publication universitaire (1992) ,2:68-800.
- Sevenet Tel Coll., Plantes, molécules et médicaments. NatLan CNRS édition, (1994).
- Shorderet M., Pharmacologie des concepts. Edition O.P.U. (1989).
- Sociedad espanola de Quimica Clinica,Comité Cientifico ,Comision de Enzimas .método recomendado para la determinacion en rutina de la concentracion catalitica de la aspartato aminotransferasa en suero sanguineo humano .Quim Clin (1987) ;6 :253-239.. In BioSysteme REAGENTS&INSTRUMENTS
- Sociedad Espanola de Quimica Clinica, Comité Cientifico. Comision de Enzimas. método recomendado para la determinacion en rutina de la concentracion catalitica de la alalina aminotransferasa en suero sanguineo humano .Quim Clin (1987) ;6 :241-244 . In BioSysteme REAGENTS&INSTRUMENTS
- Steinherz L & Steinherz P., Delayed cardiac toxicity from antracycline therapy.Pediatrician. (1991) ; 18:49 -52
- Tainer JA., Rorets VA., Fiher CL., Hallewell RA & Getzoff ED., Mecanisme and structure of superoxide dimitase, A study of enzyme, (1988), 2499-538.
- Tamborini A., Actualité en cancerologie gyne cologique et maniane poris, ESKA, (2ème cycle d'étude sientifique, medicales et phormaceutiques),(1997)
- Turrens J.,Alexande A & Leninger A. Ubi semiquinanr is the election donor for syperoxide formation by complexe III of heart mitochondria. Archi Biochimie biophys,(1985), 237: 408-414
- Twelves CJ., *et al* . Clinical pharmacokinetics of epirubicin : The importance of liver biochemesty test . BJ Cancer, (1992) , 66(4) :768-769

- Tylor D.**, Gihoa & Plan Fadosi C, reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis, Arch Biochimie biophys, (1995), **316**:70,76
- Vancomp W.**, Bawoler C., Villaroell R., Tsang E., Vanmontag M & Inzed D., Characterization of iron superoxide dismutase cDNA from plants obtained by genetic complementation in Escherchia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. USA , (1990), **87** : 9903-7.
- Velez DeLa Calle J. F.**, Bauché F. & Jégou B. Protection de la Fertilité mâle lors des traitements anticancéreux : l'expérience animale, Progrès en urologie (1992), **2**, 110-118.
- Viotte G.**, Lahouel M. Ducastelle Th., Sumereau E., Morin J. P., Hemet J. & Filastre J.P. Hépatotoxicité du -(2-chloroéthyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosou) ou CCNU chez le rat. Path Biol (1986), **34**, n°1, 40-47.
- Weenen H.**, Van Maanen JMS., Deplanque MM., Mcvie JG & Pinedo HM., Metabolisme of 4'-modified analogs of doxorubicin. unique glucuronidation pathway for 4' epidoxorubicin. Eur J Cancer Clin Oncol (1984) , **20** : 7: 919 -926.
- Wilo J.**, Vtama I., Sola L., Smeets J & Riva A., Phase II study of high dose epirubicin in non-small cell lung cancer (1990), **26**:1140-1141.
- Wilson J.**, Principe de médecine , 5^{ème} édition . Médecine science flamarion, (1991).
- Zachariaeh.**, Liver biopsies and methotexate : a time for reconsideration. J Am Acad Dermatol, (2000), **42**: 531-534.
- Zelko IN.**, Mariani TJ & Folz RJ., Superoxide Dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD(SOD3) gene structure, evolution, and expression, FreeRad . Biol. Med, **33**(3), (2002), 337.



Annexe I : le protocole de traitement des animaux

Rats Traité	Epirubicine		Méthotrexate 1 ^{ère} administration			Méthotrexate 2 ^{ème} administration		
	Poids (g)	Doses ml	Poids (5g)	Surfaces M ²	Doses µl	Poids (g)	Surfaces M ²	Doses µl
1	146.2	0.7	-	-	-	-	-	-
2	143	0.7	-	-	-	-	-	-
3	129	0.6	-	-	-	-	-	-
4	128.2	0.6	-	-	-	-	-	-
5	102.8	0.5	-	-	-	-	-	-
6	85.4	0.4	85.4	18.62x10 ⁻³	93.1	90.7	19.41x10 ⁻³	97
7	98	0.5	98	20.46x10 ⁻³	102.3	84.4	18.47x10 ⁻³	92.35
8	96.2	0.5	96.2	20.20x10 ⁻³	101	71.5	16.50x10 ⁻³	82.5
9	83.4	0.4	83.4	18.32x10 ⁻³	91.6	86.5	18.79x10 ⁻³	93.95
10	84.4	0.4	84.4	18.47x10 ⁻³	92.35	79.5	17.73x10 ⁻³	88.65

Annexe II : mesure du poids des rats

	semaine rat	1 ^{ère} semaine	2 ^{ème} semaine	3 ^{ème} semaine	4 ^{ème} semaine
lot1 témoin	T1	78.07 ± 5.2	104.54 ±13.52	-	-
	T2	75.6 ±4.89	98.06 ±11.39	131.51 ±10.24	-
	T3	80.72 ±8.18	101.68 ±11.17	143.06	184.6 ±12.45
	T4	94.27 ±17.01	-	-	-
	T5	70.37 ±6.09	98.52 ±12.32	142.75 ±14.46	178.3 ±10.66
lot2	R1	144.1 ±2.73	-	-	-
	R2	144.54 ±2.17	145.56 ±3.41	150 ±5.03	149.16 ±5.08
	R3	127.27 ±2.15	-	-	-
	R4	127.82 ±3.09	130.45 ±7.2	154.01 ±6.04	-
	R5	104.24 ±2.9	112.06 ±9.04	-	-
lot3	R6	88.92 ±4.52	-	-	-
	R7	94.08 ±4.11	-	-	-
	R8	9.31 ±6.43	-	-	-
	R9	83.74 ±3.13	-	-	-
	R10	84.07 3.77	--	-	-