

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المatricule : 73
رقم الجرد :

UNIVERSITE DE JIJEL
جامعة جيجل

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
ET MICROBIOLOGIE



Bc. 02 / 06

MEMOIRE

En vue de l'obtention du Diplôme
d'Etudes Supérieures en
Biologie Moléculaire et Cellulaire
OPTION
Biochimie
THEME



*Évaluation de l'effet hépatoprotecteur
des polyphénols de la propolis contre la
toxicité de la Vinblastine et de
l'Epirubicine.*

Membres de Jury :

Président : M^r : HENDIS MOHAMED ASSADEK

Examineur : M^r : ALYANE MOHAMED

Encadreur : M^r : LAHOUEL MESBAH

Réalisé Par :

M^{lle} : BOUSSAYOUD RAFIKA

M^{lle} : BEGHOUL AFAF

M^{lle} : BOUKABOU BARIZA

Promotion 2006

Remerciement :

Nous commençons par remercier Dieu de nous avoir donné le courage et la volonté pour mener ce travail à terme.

Nous adressons notre sincère remerciement à notre encadreur Dr : Lahouel Mesbah pour son aide, sa disponibilité, sa patience illimitée avec nous et le suivi continu de ce travail.

Nos remerciements s'adressent au membres de jury : M^{lle} Aliane M et M^{lle} Hendis M pour l'honneur d'avoir accepté de juger notre travail.

Nous tenons à remercier également toute l'équipe du Laboratoire de biologie de l'Université de Jijel, ainsi que M^{lle} Amirate pour leur aide qui contribue à la réalisation de ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à tous les étudiants de Magister de phytopharmacologie pour leurs conseils précieux pour notre travail, surtout : Mr Tarik, M^{lle} Wided, M^{lle} Asma, M^{lle} Mounia et M^{lle} Wassila sans oublier notre collègue : M^{lle} Khaled.

Nous remercions également tous ceux qui nous ont aidé et encouragé de près ou de loin. durant la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

Introduction :	01
Chapitre I : Analyse bibliographique :	
I-1- Le foie et sa place dans la détoxification :	03
I-1-1- Le foie.....	03
I-1-1-1- Les fonctions du foie.....	03
I-1-1-2- Fonction de détoxification.....	03
I-1-2- Pathologie du foie.....	04
I-1-2-1- Les hépatites virales.....	04
I-1-2-2- Les hépatites vasculaires.....	05
I-1-2-3- Les hépatites toxiques.....	05
I-1-2-4- Les hépatites auto-immunes.....	05
I-1-2-5- Les hépatites médicamenteuses.....	05
I-1-3- Marqueurs d'évaluation de l'hépatotoxicité.....	06
I-1-3-1- Les transaminases.....	06
I-1-3-1-1- ALAT/GPT: "alanine amino transférase".....	06
I-1-3-1-2- AsAT/GOT: "aspartate amino transférase".....	06
I-1-3-2- La phosphatase alcaline.....	07
I-1-3-3- Le γ -glutamyl transpeptidase.....	07
I-1-3-4- Autres marqueurs.....	07
I-1-3-4-1- Protéines sériques.....	07
I-1-3-4-2- Ammonémie.....	07
I-1-3-4-3- Bilirubine.....	07
I-2- Hépatite médicamenteuse :	08
I-2-1- Introduction.....	08
I-2-2- Métabolisme hépatique des xénobiotiques (médicaments).....	08
I-2-2-1- Le métabolisme.....	08
I-2-2-1-1- Oxydation.....	09
I-2-2-1-1-1- Définition.....	09
I-2-2-1-1-2- Les enzymes.....	09
I-2-2-1-1-2-1- Système cytochrome P ₄₅₀	09
I-2-2-1-1-2-2- Les autres enzymes.....	09
I-2-2-1-1-3- Le mécanisme d'action.....	10
I-2-2-1-2- La conjugaison.....	10
I-2-2-1-2-1- Définition.....	10
I-2-2-1-2-2- Les enzymes.....	10
I-2-2-1-2-3- Le mécanisme d'action.....	10
I-2-2-1-3- Métabolisme de l'Epirubicine.....	10
I-2-2-1-4- Métabolisme de la Vinblastine.....	-

I-2-3- La physiopathologie.....	11
I-2-3-1- Les biotransformations hépatiques.....	11
I-2-3-2- Mécanisme de l'hépatotoxicité.....	11
I-2-3-2-1- Toxicité du médicament lui-même.....	11
I-2-3-2-2- Toxicité d'un métabolite stable.....	11
I-2-3-2-3- Toxicité des métabolites instables.....	11
I-2-3-2-3-1- Formation d'un métabolite instable.....	11
I-2-3-2-3-2- Mécanisme de toxicité.....	12
I-2-3-2-3-3- Cibles des métabolites réactifs.....	12
I-2-3-2-3-4- Induction enzymatique.....	13
I-2-3-2-3-5- Mécanisme de protection.....	13
I-2-3-2-3-6- Hépatotoxicité des métabolites réactifs.....	13
I-2-3-2-3-6-1- Toxicité usuelle.....	13
I-2-3-2-3-6-2- Toxicité idiosyncrasique.....	13
I-2-3-2-3-6-3- Hépatite immuno-allergique.....	14
I-2-4- La peroxydation lipidique et antioxydants.....	14
I-2-4-1- Le stress oxydatif.....	14
I-2-4-1-1- Définition.....	14
I-2-4-1-2- Origine du stress oxydant.....	14
I-2-4-1-3- Les radicaux libres.....	14
I-2-4-1-4- Effets des radicaux libres.....	15
I-2-4-1-4-1- Rôle physiologique.....	15
I-2-4-1-4-2- Effets néfastes.....	15
I-2-4-2- La peroxydation lipidiques.....	16
I-2-4-2-1- Définition.....	16
I-2-4-2-2- Les étapes de la peroxydation lipidique.....	16
I-2-4-2-3- Le malonedialdéhyde:MDA.....	18
I-2-4-3- Les défenses antioxydantes.....	18
I-2-4-3-1- Les antioxydants enzymatiques.....	18
I-2-4-3-1-1- La superoxyde dismutase (SOD).....	18
I-2-4-3-1-2- La catalase.....	19
I-2-4-3-1-3- Les glutathions peroxydases.....	19
I-2-4-3-1-4- Les thioredoxines (TRx) et la thioredoxines réductase (TRxR).....	19
I-2-4-3-1-5- L'hème oxygénase.....	19
I-2-4-3-1-6- Les protéines du stress thermique.....	19
I-2-4-3-2- Les molécules de petite taille.....	19
I-2-4-3-2-1- Le glutathion.....	19
I-2-4-3-2-2- Les caroténoïdes.....	20
I-2-4-3-2-3- La vitamine C.....	21
I-2-4-3-2-4- La vitamine E.....	21
I-2-4-3-2-5- Les protéines thiols.....	21
I-2-4-3-2-6- L'ubiquinone.....	21
I-2-4-3-2-7- Les polyphénols.....	21
I-2-4-3-2-8- L'acide urique.....	21
I-2-4-3-3- Les oligoéléments.....	21
I-2-4-3-4- Les protéines de fixation des métaux lourds.....	21
I-3- Rôle des polyphénols dans les défenses antioxydantes :	22
I-3-1- Introduction :.....	22

I-3-2- Définition des polyphénols.....	22
I-3-3- Structure des polyphénols.....	23
I-3-4- Voies de synthèse.....	23
I-3-4-1- La voie de Shikimate.....	23
I-3-4-2- La voie de l'acétate.....	23
I-3-4-3- La voie d'origine mixte.....	24
I-3-5- Origine et localisation des polyphénols.....	25
I-3-5-1- Dans le monde végétal.....	25
I-3-5-2- Dans le monde animal : <i>la propolis</i>	25
I-3-5-2-1- Définition de la <i>propolis</i>	25
I-3-5-2-2- Les constituants de la <i>propolis</i>	25
I-3-6- les flavonoïdes.....	26
I-3-6-1- Les propriétés des flavonoïdes.....	26
I-3-6-2- Activités pharmacologiques des flavonoïdes.....	27
I-3-6-2-1- Activité antioxydante.....	27
I-3-6-2-2- Activité antitumorale.....	27
I-3-6-2-3- Activité anti-inflammatoire.....	27
I-3-6-2-4- Activité antidiabétique.....	27
I-3-6-2-5- Autres activités.....	27
I-3-6-3- Les flavonoïdes contre les radicaux libres.....	28
I-3-7- Propriétés et activités biologiques des polyphénols.....	28
I-3-8- Propriétés chimiques des polyphénols.....	29
I-3-8-1- Coupure homolytique.....	29
I-3-8-2- Oxydation du noyau aromatique.....	29
I-3-9- La biodisponibilité des polyphénols.....	30
I-4- Cancer et chimiothérapie anticancéreuse :.....	31
I-4-1- Le cancer.....	31
I-4-1-1- Définition.....	31
I-4-1-2- Diagnostic.....	31
I-4-1-3- Traitement du cancer.....	31
I-4-1-3-1- La chirurgie.....	31
I-4-1-3-2- La radiothérapie.....	32
I-4-1-3-3- La chimiothérapie.....	32
I-4-1-3-4- L'hormonothérapie.....	32
I-4-1-3-5- L'immunothérapie.....	32
I-4-2- La chimiothérapie anticancéreuse.....	32
I-4-2-1- Définition.....	32
I-4-2-2- La polychimiothérapie.....	32
I-4-2-3- Classification des cytotoxiques selon leurs action dans le cycle cellulaire.....	33
I-4-2-4- Mécanisme généraux de l'action cytotoxique.....	34
I-4-2-5- Classification des médicaments anticancéreux.....	35
I-4-2-6- Les effets secondaires des substances cytotoxiques.....	36
I-4-2-6-1- Toxicité hépatique.....	36
I-4-2-6-2- Les autres effets secondaires.....	36
I-4-2-7- L'Epirubicine.....	36
I-4-2-7-1- La structure chimique.....	37
I-4-2-7-2- Les indications.....	37
I-4-2-7-3- Posologie et mode d'administration.....	37

I-4-2-7-4- Mécanisme d'action.....	37
I-4-2-7-5- La pharmacocinétique.....	38
I-4-2-7-5-1- Absorption.....	38
I-4-2-7-5-2- Répartition.....	38
I-4-2-7-5-2-1- Demi vie, taux plasmatique, élimination.....	38
I-4-2-8- La Vinblastine.....	38
I-4-2-8-1- La structure chimique.....	39
I-4-2-8-2- Les indications.....	39
I-4-2-8-3- Posologie et mode d'administration.....	39
I-4-2-8-4- Mécanisme d'action.....	39
I-4-2-8-5- La pharmacocinétique.....	40
I-4-2-8-5-1- Absorption.....	40
I-4-2-8-5-2- Répartition.....	40
I-4-2-8-5-3- Demi vie, taux plasmatique, élimination.....	40

Chapitre II : Matériel et méthode:.....41

II-1- Matériel41

II-1-1- Les animaux.....	41
II-1-1-1- Entretien des animaux.....	41
II-1-1-2- Traitement des animaux.....	41
II-1-2- La propolis.....	41

II-2- Méthodes40

II-2-1- Préparation des solutions administrées.....	42
II-2-1-1- La solution de l'extrait de la propolis.....	42
II-2-1-2- Les solutions médicamenteuses.....	42
II-2-1-2-1- La Vinblastine.....	42
II-2-1-2-2- L'Epirubicine.....	43
II-2-2- Voies d'administration des différentes solutions.....	44
II-2-2-1- Gavage gastrique.....	44
II-2-2-2- Voie intraveineuse.....	44
II-2-3- Les prélèvements.....	44
II-2-3-1- Prélèvement du sang.....	44
II-2-3-2- Prélèvement de l'organe (le foie).....	45
II-2-4- Etude de l'hépatotoxicité.....	46
II-2-4-1- Évaluation de cytolyse hépatique.....	46
II-2-4-1-1- Principe de dosage.....	46
II-2-4-1-2- Composition des réactifs utilisés.....	46
II-2-4-1-3- Protocole de dosage.....	47
II-2-4-2- Evaluation du stress oxydatif.....	48
II-2-4-2-1- Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	48
II-2-4-2-1-1- Principe de dosage.....	48
II-2-4-2-1-2- Les réactifs utilisés.....	48
II-2-4-2-1-3-Protocole d'évaluation du MDA.....	49
II-2-4-2-1-3-1- Préparation de l'homogénat.....	49

I-2-4-2-1-3-2- Etapes de dosage.....	49
I-2-4-2-1-4- Réalisation de la courbe d'étalonnage.....	49
II-2-4-2-2- Dosage du glutathion (GSH).....	50
II-2-4-2-2-1- Principe de dosage.....	50
II-2-4-2-2-2- Les réactifs utilisés.....	50
II-2-4-2-2-3- Protocole de dosage de GSH.....	51
II-2-4-2-2-4- Réalisation de la gamme étalonnage de GSH.....	51
II-2-4-2-2-4-1- Préparation de la solution mère.....	51
II-2-4-2-2-4-2- Préparation des dilutions.....	51
II-3- Évaluation statistique.....	51
Chapitre III : Résultats et interprétation	52
✦ III-1- La mortalité des animaux et les effets indésirables remarqués.....	52
III-2- Résultats et interprétation de l'étude de la toxicité hépatique.....	52
III-2-1- Le dosage sérique des transaminases (TGP).....	52
III-2-1-1- Résultats	52
III-2-1-2- Interprétations.....	53
III-2-2- Le dosage cytosolique.....	54
III-2-2-1- Évaluation du malondialdéhyde (MDA).....	54
III-2-2-1-1- Résultats.....	54
III-2-2-1-1-1- Résultats de la réalisation de la courbe d'étalonnage du MDA.....	54
III-2-2-1-1-2- Résultats de dosage du MDA.....	54
III-2-2-1-2- Interprétations.....	55
III-2-2-2- Évaluation du glutathion (GSH)	56
III-2-2-2-1- Résultats.....	56
III-2-2-2-1-1- Résultats de la réalisation de la courbe d'étalonnage du GSH.....	56
III-2-2-2-1-2- Résultats de dosage du GSH.....	57
III-2-2-2-2- Interprétations.....	58
Chapitre IV : Discussion.....	59
Chapitre V : Conclusion.....	64
Annexe	
Bibliographie	

Liste des tableaux

- Tableau 01** : Principales enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments.
- Tableau 02** : Composés phénoliques les plus importants et groupes de substances correspondants.
- Tableau 03** : Les différents constituants de la *propolis*.
- Tableau 04** : Activités biologiques des polyphénols.
- Tableau 05** : Classification des substances anticancéreuses.
- Tableau 06** : Volume d'échantillon et température correspondante.
- Tableau 07** : Les calculs correspondants à chaque température.
- Tableau 08** : Étapes de la réalisation de dosage du MDA.
- Tableau 09** : Évaluation des activités du TGP (UI) après traitement par la Vinblastine (1mg/kg) et l'Epirubicine (1,60mg/kg) seuls ou associés à la *propolis* (100mg/kg).
- Tableau 10** : La représentation de résultats de la courbe d'étalonnage du MDA.
- Tableau 11** : Variation des taux de Malonedialdéhyde (MDA) du tissu hépatique par n mol/g du foie suivant l'administration de la Vinblastine (1mg/kg) et l'Epirubicine (1,60mg/kg) seuls ou associés à la *propolis* (100mg/kg).
- Tableau 12** : La représentation des résultats de la courbe d'étalonnage du GSH.
- Tableau 13** : Variation des taux du Glutathion (GSH) hépatique par mM/g du foie après l'injection de la Vinblastine (1mg/kg) et l'Epirubicine (1,60mg/kg) seuls ou associés à la *propolis* (100mg/kg).

Listes des schémas et photos

Liste des schémas

- SCHEMA 01** : Réaction d'hydroxylation d'un médicament.
- SCHEMA 02** : Transformation hépatique des médicaments.
- SCHEMA 03** : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.
- SCHEMA 04** : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et natures des produits terminaux formés.
- SCHEMA 05** : Structure chimique du MDA.
- SCHEMA 06** : La formule chimique du Glutathion (GSH).
- SCHEMA 07** : Formation du radical phénoxy, mésomérie : Exemple de couplage oxydatif.
- SCHEMA 08** : Oxydation des phénols : Ouverture du cycle catalysés par une dioxygénase.
- SCHEMA 09** : Schéma simplifié d'action de quelques médicaments ou catégories de médicaments anticancéreux en fonction du cycle cellulaire.
- SCHEMA 10** : Schéma général d'action des médicaments anticancéreux.
- SCHEMA 11** : La structure chimique d'Epirubicine.
- SCHEMA 12** : La structure chimique de la Vinblastine.
- SCHEMA 13** : Protocole d'extraction des principes actifs de *la propolis*.
- SCHEMA 14** : Réaction du malonedialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique.
- SCHEMA 15** : Réaction du GSH avec DTNB.

Liste des photos

- PHOTO 01** : Méthode du prélèvement sanguin.
- PHOTO 02** : Méthode du prélèvement du foie.

Liste des courbes et histogrammes

Courbe 01 : La courbe d'étalonnage du MDA.

Courbe 02 : La courbe d'étalonnage du GSH.

Histogramme 01 : La variation de l'activité du TGP au cours d'un traitement par la Vinblastine (1mg/kg) et l'Epirubicine (1,60mg/kg) seuls ou associés à la *propolis* (100mg/kg) en fonction du temps (jours).

#

Histogramme 02 : Variation de la concentration du MDA par nM/g du foie au cours d'un traitement par la Vinblastine (1mg/kg) , l'Epirubicine (1,60mg/kg) et l'extrait de la *propolis* (100mg/kg) en fonction du temps (jours).

Histogramme 03 : Évaluation de la concentration du GSH par mM/g du foie durant 21 jours après l'administration de la Vinblastine (1mg/kg) , l'Epirubicine (1,60mg/kg) et l'extrait de la *propolis* (100mg/kg) en fonction du temps (jours).

Les abréviations

ADN : acide Désoxyribo-nucléique.

ARN : acide ribonucléique.

ARNm : ARN messenger.

DO : densité optique.

DTNB : 5,5'- dithiobis (2, nitrobenzoic acide 99%).

g : gramme.

GSH : glutathion réduit.

J : Jour.

KCl : chlorure de potassium.

LOOH : radical lipidique.

MDA : malonedialdéhyde.

mg/Kg : milligramme par Kilogramme.

ml / Kg : millilitre par kilogramme.

mM : millimolaire.

mmol/g: millimole par gramme.

NaCl: chlorure de sodium.

NAD⁺: nicotinamide adénine dinucléotide oxydé.

NADH,H⁺: nicotinamide adénine dinucléotide réduit.

NADP⁺: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé.

NADPH,H⁺: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit.

Na₂HPO₄ : phosphate dissodique.

nm : nanomètre.

nM : nano mole.

nmol/g: nanomole par gramme.

r : Coefficient de corrélation.

RH: lipide insaturé.

RO^o: radical alcoxyle.

ROO^o: radical perhydroxyle.

TBA : Acide thiobarbiturique.

TCA : trichlorureacétique.

TGP : transaminase glutamo-pyruvique..

TMP : tétramétoxypropane.

UI: unité international.

Introduction

Introduction :

Le cancer provoque le décès d'un cinquième de la population et il est difficile à l'heure actuelle de le dépister suffisamment tôt pour pouvoir le guérir (LAHOUEL et al ,2004).

La chimiothérapie anticancéreuse est un traitement médicamenteux qui a pour but d'éliminer les cellules cancéreuses dans l'ensemble des tissus (NAUDIN et al, 2000).

Elle a connue un développement rapide depuis l'apparition en 1946 de la moutarde d'azote, longtemps réservée au traitement des cancers à leur phase terminale; elle a pris place comme thérapeutique majeure à part entière, au même titre que la chirurgie, la radiothérapie et l'immunothérapie (FOA et al, 1985).

✦ Malheureusement, les médicaments anticancéreux n'agissent pas uniquement sur les cellules tumorales. Ils sont également toxiques pour les cellules normales, à renouvellement rapide et pour certains organes (NAUDIN et al, 2000).

Les médicaments qui sont introduits dans l'organisme doivent être excrétés, avant leur élimination, la plupart de ces produits subissent un certains nombres de biotransformations qui les rendent en général des métabolites plus hydrosolubles.

La majorité de ces transformations de nature enzymatique, s'effectue dans le foie par le biais du système des cytochromes P₄₅₀ (FOUET, 1978).

L'hépatotoxicité résultante de l'activité du cytochrome P₄₅₀ peut faire intervenir plusieurs mécanismes en particulier, la production d'un métabolite réactif et la production secondaire d'espèces réactives dérivées de l'oxygène appelées: radicaux libres; qui sont à l'origine d'un stress oxydant conduisant à de nombreux pathologies.

Les polyphénols constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal.

De nos jours, les activités pharmacologiques des polyphénols sont amplement étudiées, ils jouent un rôle très important dans le domaine médical notamment leurs activités antioxydantes.

Plusieurs recherches sont effectuées, d'autres sont en cours (BOULKOUR, 2004).


Notre recherche visait à étudier l'hépatotoxicité des médicaments anticancéreux administrés pour des rats albinos avec l'évaluation de :

- L'effet hépatotoxique des médicaments anticancéreux : Vinblastine et Épirubicine.
- L'effet hépatoprotecteur des polyphénols.
- Les propriétés antioxydantes des polyphénols.


Pour cela on administre la solution polyphénolique chez des rats pour les donner une prévention; puis on administre deux médicaments anticancéreux (la Vinblastine et l'Épirubicine associés) ; qui est un protocole thérapeutique expérimental.

On suit les résultats des testes biochimiques et cytosoliques chaque semaine pendant trois semaines, entre le lot prétraité (prétraité par les polyphénols puis traité par les anticancéreux) d'une part, et le lot traité uniquement par les anticancéreux d'autre part. Ces résultats sont suivis en parallèle avec le lot témoin.

§



Chapitre I
Analyse
bibliographique



I-1- Le foie et sa place dans la détoxification :

I-1-1- Le foie :

Le foie est l'organe le plus volumineux et le plus complexe, au point de vue métabolique (HILDEN et al, 2000). D'une part, il possède la plus grande capacité à se régénérer après destruction partielle, d'autre part il est indispensable à la survie de l'organisme comme le montre les expériences de l'hépatectomie totale (VASEY, 1997)

I-1-1-1- Les fonctions du foie :

Le fonctionnement hépatique fait intervenir plusieurs types cellulaires, leur coopération assure la plupart des fonctions hépatiques (ROREL et al, 1997).

- La production de la bile "les hépatocytes produisent environ 500 à 1000 ml de bile par jour".
- Fonction de détoxification.
- La synthèse de nombreux protéines ou autres molécules.
- La détoxification de l'alcool, des médicaments et autres hormones.
- Le métabolisme des hydrates de carbone, des protéines, des graisses et des vitamines
- Le stockage d'une multitude de substances, dont la vitamine B₁₂, le fer, le cuivre et le glucose (sous forme de glycogène) (LANGLIS-WILIS et al, 1996).

I-1-1-2- Fonction de détoxification :

Le foie est l'organe de référence en terme d'activité de biotransformation des xénobiotiques, il contient les plus grandes concentrations et variétés de cytochromes et autres enzymes de phase 1 et 2 (Tableau 01).

La biotransformation représente l'ensemble des réactions biochimiques que subissent les substances endogènes et exogènes qui conduit à une diminution de leur lipophilicité et une augmentation de leur polarité.

Le but ultime du métabolisme est de faciliter l'excrétion de ces substances hors de l'organisme. Dans la majorité des cas, les conséquences de la biotransformation sont de diminuer l'activité pharmacologique des xénobiotiques tout en favorisant leur élimination (GONZALEZ et al, 1990).

Tableau 01 : Les principales enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments :
(GONZALEZ et al 1990).

Oxygénases et oxydases	Hydrolases
Cytochromes P ₄₅₀	Estérases
Flavo-mono-oxygénases	Amidases
Peroxydases	Epoxides hydrolases
Monoamines oxydases	γ -Glutamyl transpeptidases
Alcool déhydrogénases	Dipeptidases
Aldéhyde déhydrogénases	Cystéine conjuguée β -lyase
Aldo-kéto réductases	Enzymes de conjugaison
Aldéhyde oxydases	Glutathion S-transférases
Quinone réductases	Sulfotransférases
Enzymes piègeurs des radicaux libres	Acétyltransférases
Superoxide dismutases	UDP-glucuronyltransférases
Catalases	Méthyltransférases
Glutathion peroxydases	Conjugaison de la glycine

I-1-2- Pathologie du foie :

L'inflammation du foie est appelée hépatite, elle est de causes multiples. Toutes les maladies du foie peuvent à la longue engendrer une hépatite (HILDEN et al, 2000) :

I-1-2-1- Les hépatites virales : maladies infectieuses, contagieuses, à virus hépatotrope. Il existe au moins cinq types d'hépatites virales, liées chacune à un virus différent :

→L'hépatite A est transmise par la consommation d'eau ou d'aliments contaminés.

→L'hépatite B est transmise par contact avec le sang ou d'autres liquides organiques d'une personne infectée.

→L'hépatite C appelée avant l'identification du virus VHC "hépatite non A non B" est transmise par contact direct avec le sang d'une personne infectée.

→L'hépatite D, hépatite rare qui atteint le plus souvent des personnes qui ont fait usage de drogues intraveineuses et sont parallèlement porteuses du virus de l'hépatite B.

→L'hépatite E est transmise et évolue généralement comme l'hépatite A.

→L'hépatite G dont le virus a été identifié récemment. Ce virus ainsi que l'hépatite qu'il

I-1-3- Marqueurs d'évaluation de l'hépatotoxicité :

Le foie est l'organe qui renferme le plus d'enzymes. Certaines sont spécifiques de cet organe, d'autres sont également présentes dans d'autres tissus, mais leur concentration hépatique est souvent plus importante (CHAREL, 1991).

Le terme de cytolyse correspond à la libération du contenu de la cellule par perte de l'intégrité de la membrane cellulaire. Elle signe la nécrose cellulaire au cours de laquelle les fonctions métaboliques de la cellule sont perdues de façon irréversible, elle est caractérisée par la disparition du noyau, le gonflement des organelles intracellulaires et la formation de bulles, projetées à travers la paroi de la membrane plasmique dont la rupture se traduit par la libération des enzymes cytoplasmiques (VAUBOURDOLLE, 1998).

§

Les dosages enzymatiques ont un rôle essentiel au cours de toutes les affections hépatobiliaires, tant sur le plan du diagnostic que sur celui de la surveillance de l'évolution (FOUET, 1978).

Les principales enzymes étudiées sont

I-1-3-1- Les transaminases :

I-1-3-1-1- ALAT/GPT : "alanine amino transférase" : également connue sous le nom de glutamate-pyruvate-transaminase. L'ALAT catalyse le transfert du groupe amine de la L-alanine vers l' α -cétoglutarate pour donner du L-glutamate, les niveaux les plus élevés sont rencontrés dans le foie et les reins. De plus faibles quantités sont également présentes dans le cœur et les muscles squelettiques.

La concentration en ALAT augmente principalement lorsque les cellules hépatiques sont atteintes (nécrose des cellules du foie ou tout autre dommage touchant ces cellules). La mesure des activités sériques en ALAT et en ASAT permet de faire une distinction entre une hépatite et une lésion touchant un autre parenchyme (HENDERSON et al, 2000).

I-1-3-1-2- ASAT/GOT: "aspartate amino transférase" :

Est une transaminase également connue sous le nom de glutamate-oxaloacétate-transaminase (GOT), elle catalyse le transfert du groupe amine du L-aspartate vers l' α -cétoglutarate pour donner du L-glutamate. L'ASAT est présente dans de nombreux tissus, les

activités plus importantes étant rencontrées au niveau du cœur, des muscles squelettiques, du foie et des reins; les dommages causés aux cellules de ces tissus induisent une augmentation du taux sérique (HENDERSON et al, 2000).

I-1-3-2- La phosphatase alcaline :

Le sérum humain contient plusieurs formes de phosphatase alcaline, qui est une enzyme provenant de la membrane plasmique qui hydrolyse les esters de phosphates au pH alcalin. Ces activités sériques proviennent de l'os, de l'intestin du foie et du placenta. En absence de maladies osseuses ou de grossesse, des taux élevés de phosphatases alcalines témoignent habituellement d'une atteinte de la fonction biliaire (PODOLSKY et al, 2000).

I-1-3-3- Le γ -glutamyl transpeptidase :

Cette enzyme catalyse le transfert du groupement gamma-glutamyl sur d'autres peptides. Son activité est particulièrement élevée dans les reins, et moins importante dans le foie, le pancréas. Une faible activité est normalement observée dans le plasma. Elle s'élève au cours d'affections hépatobiliaires variées (FOUET, 1978).

I-1-3-4-Autres marqueurs :

I-1-3-4-1- Protéines sériques :

Une atteinte hépatique peut diminuer les concentrations sanguines d'albumine, prothrombine, fibrinogène et d'autres protéines exclusivement synthétisées par les hépatocytes (HENDERSON et al, 2004).

I-1-3-4-2- Ammonémie :

L'ammoniaque est élevée chez certains patients ayant une hépatopathie aiguë ou chronique, elle reflète habituellement une nécrose hépatique (PODOLSKY et al, 2000).

I-1-3-4-3- Bilirubine :

C'est le produit de la dégradation de l'hémoglobine, localisé et catabolisé essentiellement dans le foie puis éliminé dans les urines et les fèces.

La plupart des manifestations pathologiques se traduisent par une hyperbilirubinémie (cirrhoses, hépatites virales...) (TIETZ et al, 1986).

I-2-2-1-1- L'oxydation (fonctionnalisation du xénobiotique) :**I-2-2-1-1-1- Définition :**

La fonctionnalisation consiste à greffer un groupement réactif pour fonctionnaliser le xénobiotique (SIEST et al, 1989). Elle implique une modification structurale de la substance par réaction d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse, la transformation des xénobiotiques procède habituellement par réaction d'oxydation; l'hydroxylation est le type d'oxydation le plus fréquemment rencontré et elle peut survenir en des points différents de la molécule (DORE, 1986).

L'oxydation comporte des réactions :

- D'hydroxylation $RCH \rightarrow RCOH$ (R aliphatique ou aromatique).
- N-oxydation $(R_1-NH-R_2 \rightarrow R_1-NOH-R_2)$.
- S-oxydation $(R_1-S-R_2 \rightarrow R_1-SO-R_2)$.
- Réactions de N-ou -O-déalkylation (ALLAIN, 2002).

I-2-2-1-1-2- Les enzymes :**I-2-2-1-1-2-1-Système cytochrome P₄₅₀ :**

Est un système oxydatif capable d'hydroxyler les chaînes aliphatiques et les noyaux aromatiques, de désaminer, d'enlever des groupements alkyles à l'oxygène, à l'azote et au soufre, de produire des sulfoxides et d'enlever des groupements sulfhydryles. (DORE ,1986).

Le système est constitué de deux protéines : le cytochrome P₄₅₀ qui nécessite la présence d'une enzyme associée appelée : NADPH cytochrome P₄₅₀ réductase, l'oxygène et le NADPH comme cofacteur (NEZELOF, 1983). Le cytochrome P₄₅₀ constitue une famille d'iso enzymes à fer , et qui est une homoprotéine constituée d'une chaîne polypeptidique (apoenzyme) et d'une molécule de l'hème renfermant un atome de fer hémunique à l'état oxydée , elle catalyse un très grand nombre d'oxydations (SIEST et al ,1989) (schéma 01).

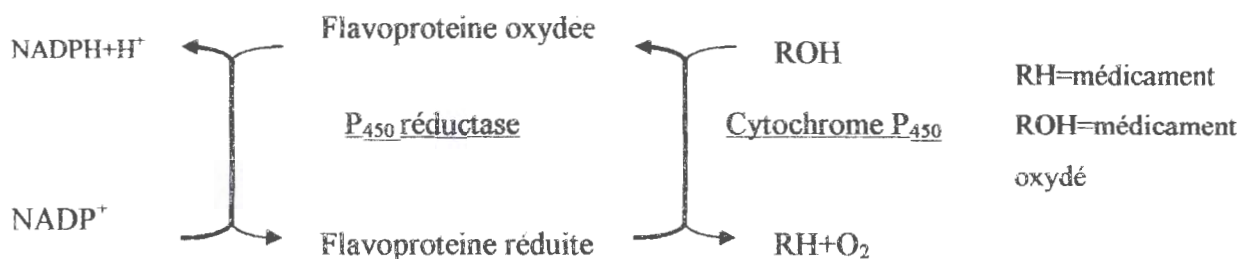


Schéma 01 : réaction d'hydroxylation d'un médicament (ALLAIN, 2001).

I-2-2-1-1-2-2-Les autres enzymes :

Les monooxygénases à flavine, les hydrolases et les transférases (SIEST et al, 1989).

I-2-2-1-1-2-3- Mécanisme d'action :

Le système monooxygénase, à cytochrome P₄₅₀ joue un rôle de détoxification évitant l'accumulation néfaste des xénobiotiques les plus divers en augmentant leur polarité et en greffant des groupements fonctionnels. Les réactions de détoxification fondées sur l'hydroxylation nécessitent la présence d'oxygène moléculaire. Ces réactions aboutissent parfois à la formation de composés électrophiles toxiques et produisent des radicaux libres (SIEST et al, 1989).

I-2-2-1-2- la conjugaison :**I-2-2-1-2-1- Définition :**

Fait appel à des réactions de conjugaisons avec des substances très polaires comme la glycine, le sulfate, ou l'acide glucuronique dont le dérivé est toujours plus polaire que la substance initiale (DORE, 1986).

$R-OH \longrightarrow R-O$ — acide glucuronique (glucuro-conjugaison) (mécanisme principal)

$R-NH_2 \rightarrow R \longrightarrow NH-COCH_3$ (N-acétylation)

$R-OH \rightarrow R \longrightarrow OSO_3^-$ (sulfatation) (ALLAIN, 2001).

I-2-2-1-2-2- Les enzymes :

Sont des transférases membranaires et cytosoliques dont les UDPGT (UDP – glucuronyl – transférase) sont les plus représentatives (SIEST et al ,1989). Elles catalysent l'établissement d'une liaison de type osidique entre l'acide glucuronique et le composé à détoxifier (DORE, 1986) qui sont phospholipidodépendants (la membrane de l'hépatocyte) et inactivées lors de toute perturbation de l'édifice membranaire. En plus de ces enzymes il y a les glutathion transférases qui favorisent la fixation de la molécule de glutathion qui est un tri peptide sur un atome électrophile d'une autre molécule (SIEST et al, 1989, ALLAIN, 2001).

I-2-2-1-2-3- Le mécanisme d'action :

Ces enzymes ont en commun la propriété d'en atténuer ou d'en supprimer la toxicité et d'en faciliter l'élimination par une solubilisation en milieux aqueux (SIEST et al ,1989).

UDP- glucuronyl – transférase agit par la conjugaison de composé à détoxifier qui est préalablement hydroxylés par les mono – oxygénases à l'acide glucuronique (DORE, 1986).

I-2-2-1-3-Métabolisme de l'Epirubicine :

Le métabolisme des anthracyclines (par exemple l'épirubicine) conduit à la production de radicaux libres (quinones diols, époxydes, superoxyde, peroxyde d'hydrogène) pouvant altérer de façon notable la double couche lipidique des membranes cellulaires ou s'associer aux DNA comme les alkylants (DIJON, 1997).

Le métabolite principal de l'Epirubicine est l'épirubicinol, mais également formation des dérivés glucuro - conjugués de l'épirubicinol et de l'épirubicine (VIDAL ,2002).

I-2-2-1-4- Métabolisme de la Vinblastine :

La Vinblastine est métabolisée dans le foie par le cytochrome P₄₅₀, elle interfère aussi dans le métabolisme de certains acides aminés conduisant à l'acide glutamique (CAPPELEARE ,2002). Le seul métabolite connu est la dé-acetyl vinblastine (VIDAL ,2002).

I-2-3- La physiopathologie :

I-2-3-1- Les biotransformations hépatiques :

A cause que l'hépatocyte possède la plupart des activités enzymatiques nécessaires à la biotransformation, et que les médicaments administrés par voie orale surtout, mais aussi par voie parentérale traversent le foie, le foie est l'organe principal de la biotransformation des médicaments (COSTIL, 1996) qui désigne les diverses modifications chimiques que subissent les médicaments dans l'organisme pour donner naissance à des métabolites (ALLAIN, 2001).

I-2-3-2- Mécanisme de l'hépatotoxicité :

L'hépatotoxicité médicamenteuse peut être directe ou indirect par l'intermédiaire de leurs métabolites (HAGEGE et al, 1977). Un médicament peut entraîner une hépatite par au moins trois mécanismes principaux:

I-2-3-2-1- Toxicité du médicament lui-même :

Lorsque le médicament est lui-même toxique, il s'agit de toxicité directe. Cette hépatite est dose dépendante et ne s'accompagne pas de manifestation clinique ou biologique d'hypersensibilité. (COSTIL, 1996)

I-2-3-2-2-Toxicité d'un métabolite stable :

Les caractères de l'hépto-toxicité sont habituellement les mêmes que ceux observés lorsque le médicament est lui-même toxique. (HAGEGE et al, 1977).

I-2-3-2-3- Toxicité d'un métabolite instable :

I-2-3-2-3-1- Formation des métabolites instables :

Une des fonctions du foie est de permettre la transformation des médicaments liposolubles en composés hydrosolubles par le biais du cytochrome P₄₅₀ (HAGEGE et al, 1977). Le métabolite formé est généralement moins toxique que le médicament lui-même ; cependant, dans certains cas, il se forme un métabolite réactif. Il semble qu'un assez grand nombre

d'hépatites médicamenteuses soit la conséquence de la formation d'une quantité excessive de ces métabolites réactifs (BENHAMOU, 1980).

I-2-3-2-3-2- Mécanisme de toxicité :

Le mécanisme de la toxicité résulte de la formation d'un métabolite réactif. Dont ce terme « métabolite réactif » signifie que le métabolite se combine spontanément, sans l'intervention d'enzyme à des macromolécules hépatiques par une réaction covalente, donc irréversible. Les macromolécules ainsi dénaturées, ne peuvent plus exercer leur activité normale et il s'ensuit un dysfonctionnement hépatocytaire (NEZELOF, 1983).

Le complexe macromolécule-métabolite réactif s'accumule dans le foie et est responsable de différentes lésions moléculaires entraînant des modifications structurales et/ou fonctionnelles de la cellule qui peuvent conduire à la nécrose cellulaire (HAGEGE et al, 1977).

I-2-3-2-3-3- Cibles des métabolites réactifs :

Ils peuvent être :

- Des protéines nécessaires à la survie hépatocytaire expliquant la nécrose.
- Des acides nucléiques.
- Des protéines membranaires ce qui explique certains phénomènes immunoallergiques.
- Des lipides insaturés.
- Du glutathion, ce composé joue un rôle essentiel, car il se combine électivement avec les métabolites réactifs et empêche ainsi la dénaturation d'autres macromolécules. La toxicité ne s'exprimera que lorsque le stock de glutathion aura été épuisé (HAGEGE et al, 1977, NEZELOF, 1983) (schéma 02).

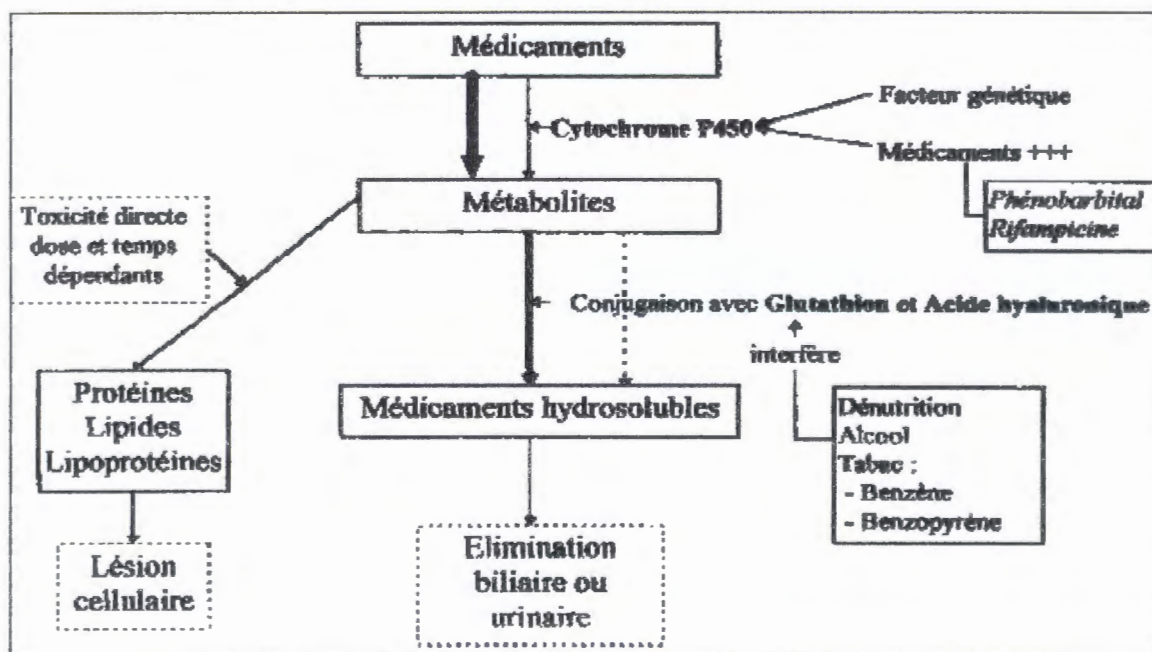


Schéma 02 : transformation hépatique des médicaments (NEZELOF, 1983)

I-2-3-2-3-4- Induction enzymatique :

L'activité des enzymes peut être modifiée par la prise de certains médicaments; soit une inhibition ou bien une induction (ALLAIN, 2001). Certains médicaments (par exemple : Rifampicine) sont capables d'augmenter l'activité enzymatique de la biotransformation surtout par augmentation de l'activité du cytochrome P₄₅₀ (ou des UDPGT) (COSTIL, 1996, et SIEST et al, 1989).

Lors de l'induction du cytochrome P₄₅₀ il y a une augmentation de la transcription d'un gène (ADN) en (ARNm) codant la synthèse de ces cytochrome, une stabilisation du (ARN m) peut également y participer.

Les conséquences de l'induction peuvent être une diminution de l'effet du médicament qui est plus vite métabolisé, ou l'apparition de sa toxicité (ALLAIN, 2001). Car la quantité des métabolites «réactifs» formés dépend de l'activité des enzymes du réticulum endoplasmique, si cette activité est augmentée, la quantité de métabolites « réactifs » formés s'élève et la toxicité du médicament augmente (BENHAMOU, 1980).

I-2-3-2-3-5- Mécanismes de protection :

La cellule a des mécanismes de protection contre les métabolites réactifs :
-Le cytochrome P₄₅₀ est détruit par le métabolite réactif, auto-limitant ainsi sa propre formation (HAGEGE et al, 1977)

- La toxicité potentielle des métabolites réactifs est limitée par de nombreux mécanisme de protection, en particulier le glutathion (COSTIL, 1996).

I-2-3-2-3-6- Hépatotoxicité des métabolites réactifs :**I-2-3-2-3-6-1-Toxicité usuelle :**

Lorsque la formation de métabolites réactifs est élevée et supérieure aux doses au-delà desquelles apparaît une nécrose hépatique, l'hépatite survient (HAGEGE et al, 1977).

I-2-3-2-3-6-2-Toxicité idiosyncrasique :

Le plus souvent, la formation des métabolites réactifs est faible et inférieur aux seuils d'hépto-toxicité (HAGEGE et al, 1977). Dans ce type de toxicité aux posologies utilisées, le médicament n'est pas toxique pour la majorité des malades : pour une minorité d'entre eux, il est toxique (BUFFET, 1999).

I-2-3-2-3-6-3- Hépatite immuno-allergique :

La fixation des métabolites réactifs sur les protéines modifie leurs structures et ne seront plus reconnues comme faisant partie du soi, et donc une réaction immunitaire cytotoxique pour les hépatocytes entraîne l'hépatite (HAGEGE et al, 1977).

I-2-4- La peroxydation lipidique et antioxydants :**I-2-4-1- Le stress oxydatif :****I-2-4-1-1- Définition :**

Se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la balance des prooxydants et les systèmes de défense(antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (PINCIMAIL, 2003).

I-2-4-1-2- Origine du stress oxydant :

Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités de dérivés réactifs de l'oxygène (GUTTERIDGE , 1993), dans ce cas la balance antioxydant/prooxydant est en équilibre. Alors que le stress oxydant est dans le cas de déficit en antioxydant et l'excès des radicaux libres. Cette rupture d'équilibre sera observée dans les intoxications par les métaux lourds, dans l'irradiation, l'exposition prolongée au soleil, au tabagisme, les pollutions et l'absorption d'alcool, des médicaments (PINCIMAIL, 2003), la défaillance nutritionnelle en antioxydants (FAVIER, 2003).

L'origine d'une production accrue des radicaux libres peut être : l'induction enzymatique, l'altération de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie, l'activation des globules blancs, la xanthine oxydase, l'oxydation d'hémoglobine, la libération du fer libre, le métabolisme accru du prostaglandine ou encore l'activation des cellules endothéliales (DARDIK et al, 2000).

I-2-4-1-3- Les radicaux libres :

Est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié (NOVELLI, 1997) sur leur orbitale externe. Il s'agit d'espèces chimiques très réactives qui cherchent dans leur environnement un électron pour s'apparier (c'est-à-dire pour former une liaison chimique). Les radicaux libres d'oxygènes proprement dits sont:(anion superoxyde $O_2^{\circ-}$, l'oxygène singulet $^1O_2^*$, radical hydroxyle OH° , monoxyde d'azote NO°) (JADOT, 1994), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est

importante (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxyde nitrite $ONOO^{\cdot}$). (NOVELLI, 1997) (Schéma 03).

I-2-4-1-2- Effets des radicaux libres :

I-2-4-1-4-1- Rôle physiologique :

A faible concentration, ils agissent comme des messagers secondaires capables de :

- Réguler le phénomène d'apoptose (GUTTERIDGE, 1992).
- Activer les facteurs de transcription (NFKB, P38, MAP kinase) (CURTIN, 2002).
- Moduler l'expression des gènes de structures codants pour les enzymes antioxydants (OWUOR, 2002).

I-2-4-1-4-2- Effets néfastes :

A forte concentration, les radicaux libres par leur nature instable sont particulièrement réactionnels et seront capables de provoquer des dégâts cellulaires importants.

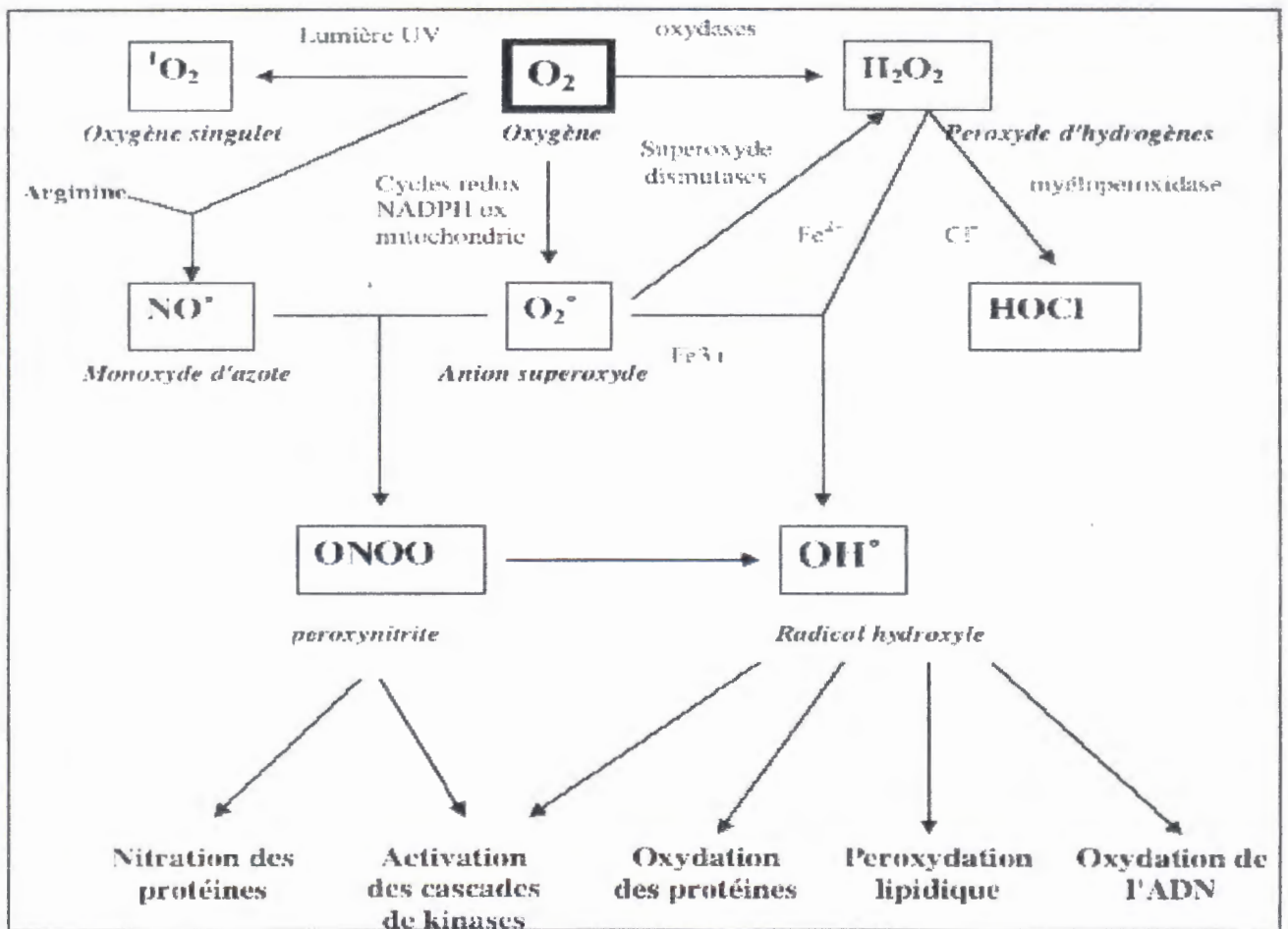


Schéma 03 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (FAVIER, 2003).

◆ Sur les acides nucléiques :

Dénaturation de l'ADN entraînant des cassures chromosomiques, des perturbations sur la multiplication, la transmission ou la réplication sont notées (JADOT, 1994).

◆ Sur les protéines :

Les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) et donc inactivées (FAVIER, 2003).

◆ Sur les sucres :

Les espèces réactives de l'oxygène attaquent les mucopolysaccharides (FAVIER, 2003).

◆ Sur les lipides : La peroxydation lipidique (FAVIER, 2003).**I-2-4-2- La peroxydation lipidique :****I-2-4-2-1- Définition :**

La peroxydation lipidique est une réaction d'oxydation des membranes cellulaires (acides gras polyinsaturés), des lipoprotéines (LDL) et de toute molécule qui contient des compositions lipidiques (MEAGER et al, 1971).

La peroxydation lipidique qui se développe comme une réaction en chaîne conduit donc à la formation de structures chimiques non physiologiques (JADOT, 1994). Il se forme des peroxydes lipidiques qui se décomposent toute fois en sous produit comme le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonanal, l'éthane ou le pentane. Comme elle peut donner aussi le 8-épirostaglandine PGF 2a appartenant à la famille des isoprostans (REILLY et al, 1996) (schéma 04).

L'oxydation des lipides conduit à la génération des radicaux lipidiques, des hydrolipopéroxydes, et leurs « aldéhydes de coupure » qui perturbent de façon importante la cohésion des membranes cellulaires et se traduisent par les effets suivants :

- Baisse de la fluidité
- Baisse des activités enzymatiques
- Modifications structurales des récepteurs à leur surface qui en empêchent la reconnaissance.
- Augmentation de perméabilité aux H⁺ ainsi qu'aux Ca⁺⁺ (pouvant mener à la rupture de l'ADN (FERRARI, 1991).

► **Extension** : Les hydroperoxydes **ROOH** peuvent également devenir des radicaux **RO^o** (alkoxyls) en présence d'un métal de transition réduit comme le fer, le cuivre, le cobalt...etc.



► **Relance** : Relance du cycle : $\text{RO}^o + \text{RH} \rightarrow \text{ROH} + \text{R}^o$ (MINOTI et al, 1992).

I-2-4-2-3- Le malondialdéhyde (MDA) :

C'est le bêta dialdéhyde tri carboné le plus simple (LEFEVRE, 2003), qu'est l'un des produits terminaux formés après cyclisation lors de la décomposition des acides gras polynisaturés médié par les radicaux libres (LAHOUEL et al ,2004). Il s'agit d'un corps qui par ses deux fonctions aldéhydes très réactives, lie transversalement les lipides, l'ADN et les protéines à l'intérieure des cellules (JADOT, 1994). Le MDA représente l'aldéhyde le plus connu des aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, et le marqueur le plus utilisé pour déterminer un stress oxydant (JANERO, 1990) (Schéma 05).

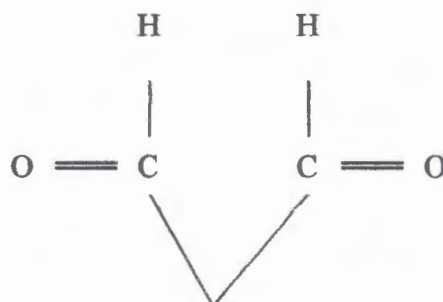


Schéma 05 : Structure chimique de MDA (HAYASHI, 1982).

I-2-4-3- Les défenses antioxydantes :

La production des radicaux libres sera strictement régulée par notre organisme, qui a développé des défenses antioxydantes peuvent nous protéger contre les effets potentiellement destructeurs des radicaux libres.

I-2-4-3-1- Antioxydants enzymatiques : La SOD

I-2-4-3-1-1-La superoxyde dismutase :

Assure l'élimination de l'anion superoxyde et assure aussi la 1^{ère} ligne de défense contre le stress oxydant . La SOD a besoin d'oligoéléments comme le cuivre et le zinc (présente dans le cytosol) ou le manganèse (mitochondrie). Il existe aussi une SOD extra cellulaire (LEVINE, 1996).



I-2-4-3-1-2- La catalase :

La catalase décompose les peroxydes d'hydrogène en molécules d'eau pour prévenir la formation de radicaux hydroxydes (GUTTERIDGE, 1993).

**I-2-4-3-1-3- Les glutathions peroxydases (GPx):**

Nécessitent le glutathion et le sélénium pour fonctionner correctement, son rôle principal est d'éliminer les peroxydes lipidiques (PINCIMAIL, 2003).

I-2-4-3-1-4- Les thioredoxines peroxydases (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR) :

¶ Une fois oxydée la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase qui intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et de peroxydes d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (MORAN, 2001).

I-2-4-3-1-5- L'hème oxygénase :

Est constitué de trois enzymes, conduit à la formation de la bilirubine qui possède une activité antioxydante puissante (RYTER, 2000).

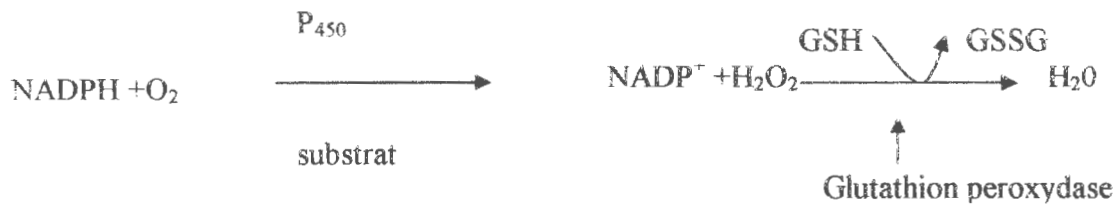
I-2-4-3-1-6- Les protéines du stress thermique :

Interviennent dans la réparation des dommages oxydatifs induits au niveau des protéines par le stress oxydant (KREGEL, 2002).

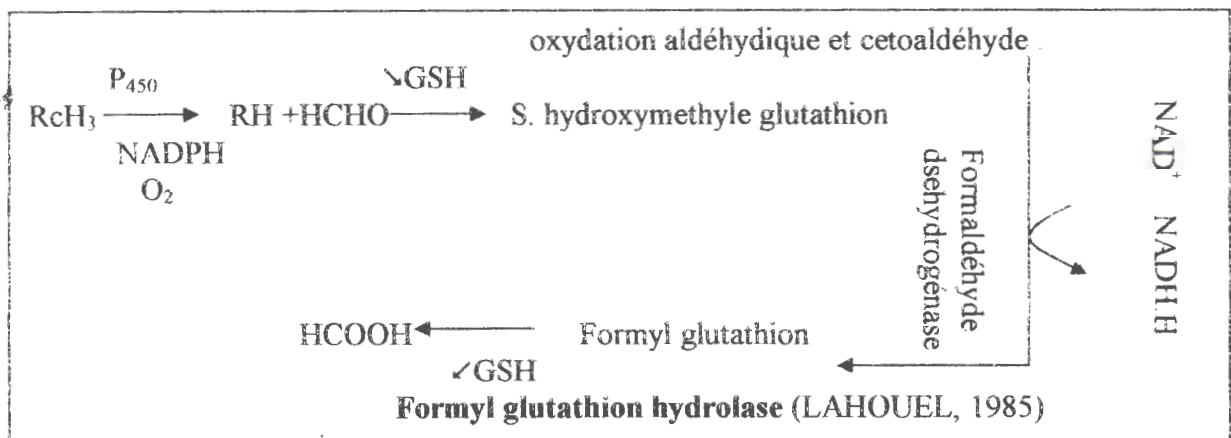
I-2-4-3-2- Les molécules antioxydantes de petite taille :**I-2-4-3-2-1- Le glutathion (GSH) :**

Le glutathion est un tri peptide (L- glutamyl- L- cysteinyl- L- glycine), doué de propriétés antioxydantes protégeant les composants cellulaires de l'action des radicaux libres (LEFEVRE, 2003). Il peut interagir directement avec les espèces oxygénées activées mais il est principalement utilisé comme substrat du glutathion peroxydase qui assure l'élimination des lipides peroxydes. Il joue également un rôle clé dans l'expression de gènes codant pour des protéines pro et anti inflammatoire (LAHOUEL ,1985) (.schéma 06) .On peut résumer le rôle détoxifiant du glutathion dans trois réactions selon :

- **Le GSH comme réducteur :**



• Le GSH comme co-facteur :



Le GSH comme nucléophile :

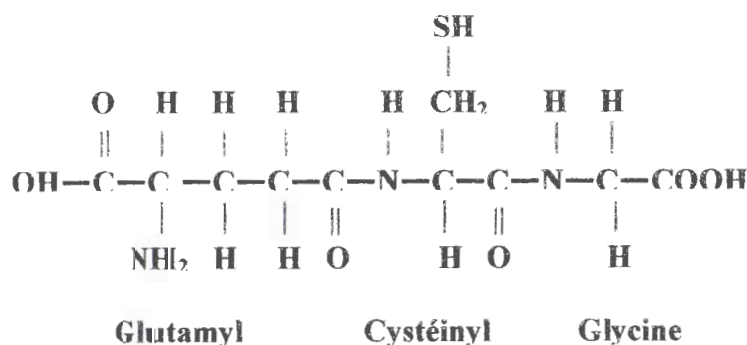
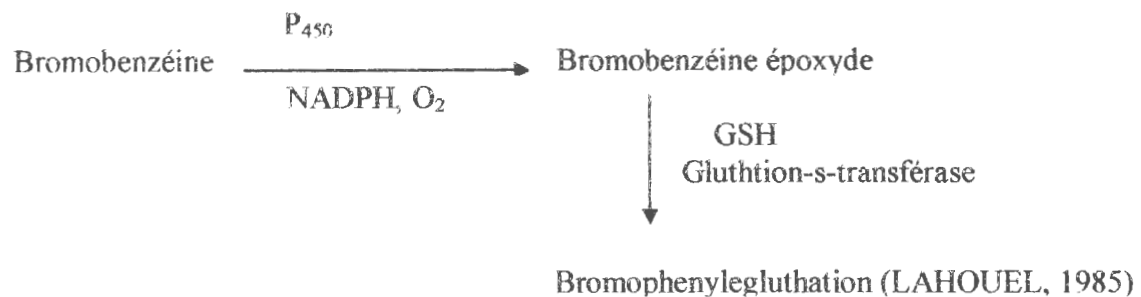


Schéma 06 : la formule chimique du glutathion (LAHOUEL, 1985)

I-2-4-3-2-2- Les caroténoïdes :

La plupart des caroténoïdes et la vitamine A interagissent avec l'oxygène singulet et peuvent ainsi empêcher l'oxydation de plusieurs substrats biologiques dont les acides gras polyinsaturés (GEY et al, 1993).

I-2-4-3-2-3- La vitamine C :

Sa concentration plasmatique dépend fortement de l'alimentation et du flux hépatique. C'est un excellent piègeur des radicaux libres qui peut protéger divers substrats biologiques (GEY et al, 1993).

I-2-4-3-2-4- La vitamine E :

Un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique, par le caractère hydrophobe qui lui permet de s'insérer au sein des acides gras empêchant ainsi la peroxydation lipidique (SOHENY et al, 2002).

I-2-4-3-2-5- Les protéines thiols :

Augmentent lors du stress oxydant et possèdent des propriétés antioxydantes (PINCIMAIL, 2003).

I-2-4-3-2-6- Le coenzyme Q₁₀ (ubiquinone) :

A un rôle vital dans la production d'énergie au niveau de la mitochondrie, et possède aussi la capacité d'inhiber la peroxydation lipidique (ERNSTR et al, 1988).

I-2-4-3-2-7- Les polyphénols :

Substances d'origine végétale, sont des antioxydants plus forts que la vitamine E (ROBAK et al, 1988).

I-2-4-3-2-8- L'acide urique :

L'acide urique possède des propriétés antioxydantes, il peut interagir avec les espèces oxygénées réactives, et tout particulièrement avec le radical hydroxyle (PINCEMAIL, 2003)

I-2-4-3-3- Les oligoéléments :

Ils participent au processus de défense contre les radicaux libres comme cofacteurs et qui sont : pour la SOD (cuivre, zinc, et manganèse), pour le glutathion peroxydase (sélénium) (GHISELLI et al, 2000).

I-2-4-3-4- Les protéines de fixation des métaux lourds :

Elles diminuent la concentration des métaux de transition capables de réagir avec les hydroxypéroxydes. On trouve :

- La transferrine qui ne transporte que de 20 à 30 % de sa capacité totale de fixer le fer, maintenant ainsi le fer libre plasmatique à des niveaux très faibles.

- La lactoferrine, qui est produite par les neutrophiles et qui est similaire à la transferrine.
- La céruloplasmine, qui a deux mécanismes antioxydants : la fixation des ions Cuivre et l'oxydation du Fe^{2+} et l'albumine par fixation des ions cuivre (GUTTERIDGE et al, 1992).

I-3- Rôle des polyphénols dans les défenses antioxydantes :

I-3-1- Introduction :

L'organisme se protège par un ensemble complexe de systèmes antioxydants, certains composés antioxydants comme les vitamines E, C, l'ubiquinone ou les caroténoïdes apportés par les aliments agissent en piégeant les radicaux et en captant les électrons célibataires les transformant en molécules ou ions stables, par contre, la vitamine devient un radical et sera soit détruite soit régénérée par autres systèmes, ainsi la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui elle même régénérée par des enzymes: les ascorbates réductases. Ce type d'antioxydants est appelé piégeurs ou éboueurs (scavenger).

De très nombreux composés exogènes peuvent avoir ce comportement : les polyphénols et les alcaloïdes phytates. Des composés endogènes jouent le même rôle dont le plus important est le glutathion réduit (GSH) qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO° . D'autres composés endogènes jouent un rôle également important mais encore mal évalué : les thioredoxines, les glutarédexines, les polyamines, les métallothioneines ou l'acide lipoïdique (KRINSKY, 1992, MATES et al, 1999, WALL, 2000).

Les composés exogènes comme les flavonoïdes (composés polyphénoliques) sont capables d'absorber et de désactiver les radicaux libres susceptibles d'être néfastes. En effet si ces radicaux se promènent dans le corps humain, ils peuvent être à l'origine de problèmes de santé chroniques tels que les maladies cardio-vasculaires, le cancer, la cataracte, les inflammations, l'arthrite et même la maladie d'Alzheimer (HERTOG, 1997).

I-3-2- Définition des polyphénols :

Les polyphénols sont des molécules qui représentent une famille très large et complexe d'où une approche essentiellement analytique (BULEON et al, 2004), ce groupe de

métabolites secondaires est caractérisé par la présence d'un ou de plusieurs groupes hydroxyles, modifiés ou non, attachés à un noyau aromatique (MAROUF, 2000). En bref, les composés polyphénoliques sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont principalement issus du métabolisme de l'acide shikimique ou/et de celui d'un polyacétate (BRUNETON, 1999).

Dans la nature, la synthèse du noyau aromatique est le fait des végétaux et micro-organismes seuls (BRUNETON, 1999). Donc les polyphénols constituent un groupe de substances variées et ubiquistes, dont font partie les flavonoïdes, les tanins, les dérivés phénylpropanoïdes tels que les lignanes, les esters et amides hydroxybenzoïques, les xanthones et de nouveaux composés sont identifiés continuellement (MAROUF, 2000), souvent, les composés phénoliques se présentent liés à des glucosides, surtout lorsqu'ils sont en solution dans le suc vacuolaire (RICHTER, 1993).

I-3-3- Structure des polyphénols :

Examinons d'abord les structures de base les plus importantes, ainsi que leurs précurseurs ; il en dérive de nombreux composés, souvent très différents par leurs configurations et leurs propriétés (tableau 02).

I-3-4- Voies de synthèse :

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromatisation et une voie mixte :

I-3-4-1- La voie de Shikimate :

La voie la plus courante est celle qui via le Shikimate (l'acide shikimique), conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénone, lignanes et lignons, coumarines. (BRUNETON, 1999).

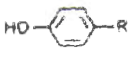
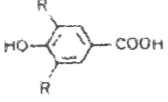
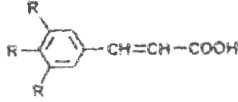
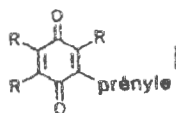
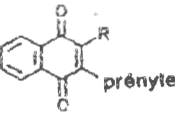
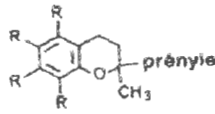
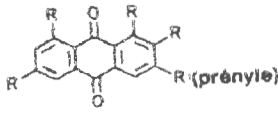
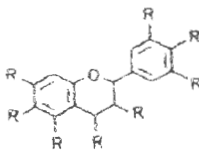
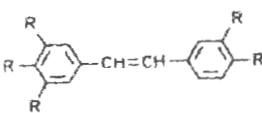
I-3-4-2- La voie de l'acétate :

L'autre voie par de l'acétate, conduit à des poly- β -cétostères de longueurs variables –les polyacétates– qui engendrent, par cyclisation des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, orcinols, depsides, depsidones, xanthones, quinones. (BRUNETON, 1999).

I-3-4-3- La voie d'origine mixte :

La participation simultanée du Shikimate et de l'acétate élabore des composés d'origine mixte (flavonoïdes, stilbènes, pyrones, xanthones, etc....) et également des dérivés mixtes du Shikimate et du mévalonate comme certains quinones ou comme les furano et pyrano coumarines et même des composés mixtes acétate – mévalonate comme les cannabinoïdes. Dans quelques cas, les trois précurseurs concourent à l'élaboration de la même structure : c'est, entre autres, celui des roténoïdes (BRUNETON, 1999).

Tableau 02 : composés phénoliques les plus importants et groupes de substances correspondantes (RICHTER, 1993)

Group de substances	Formule générale	Caractéristiques structure...
- Phénols simples		- Structure en C ₆ C ₂ , C ₆ C ₁ ou C ₆ la suite de la dégradation de la chaîne latérale.
- Acides phénolcarboxyliques	 	- Structure en C ₆ C ₃ unique ou répétée.
- Autres phénols substitués	   	- Structure en C ₆ C ₂ , C ₆ C ₁ ou C ₆ des unités isoprène complète la structure.
- Flavonoïdes		- Structure en C ₆ C ₂ C ₆ : chaînes latérales rallongées par des unités additionnelles en C ₂ .
- stilbènes		- Structure en C ₆ C ₃ C ₆ ; le carbone de la chaîne latérale est associé au second cycle en C ₆ .

I-3-5- Origine et localisation des polyphénols :

I-3-5-1- Dans le monde végétal :

Au niveau des plantes, les polyphénols interviennent dans la structure des parois (lignines, esters phénoliques dans les arabinosylanes et des pectines...), avec les tanins constitutifs des parois et aussi dans la couleur (BULEON et al, 2004). En plus les organes foliaires et reproducteurs, notamment les jeunes feuilles et les boutons floraux étaient les plus riches en polyphénols (BAHORUM et al, 1994), elles déterminent également la saveur des fruits, donc les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont abondants et diversifiés chez les plantes supérieures, particulièrement dans certaines familles : Opiacées, Astéracées et Légumineuses, Polygonacées. Ils sont présents dans tous les organes aériens, ils ont une teneur maximale dans les organes jaunes (feuilles et boutons floraux) (MAROUF, 2000).

I-3-5-2- Dans le monde animal : exemple de la propolis :

Le monde animal est très concerné par les polyphénols, surtout chez les insectes qui les fabriquent à partir des sécrétions des bourgeons de nombreux arbres et la modifient par leurs enzymes salivaires, parmi les insectes qui jouent ce rôle, on trouve les abeilles qui vivent en colonies et chaque colonie est abritée dans une ruche qui a comme un produit très précieux : la *propolis* (DONADIEU, 1975).

I-3-5-2-1- Définition de la propolis :

Le mot *propolis* vient du grec : *pro*= en avant et de *polis*=la ville. Cette substance se trouve juste « à l'entrée de la ville des abeilles » (DONADIEU, 2001). La *propolis* désigne toute une série de substances résineuses, gommeuses, et balsamiques de consistance visqueuse recueillies sur certaines parties (bourgeons et écorces essentiellement) des végétaux (certains arbres principalement) par les abeilles, qui les rapportent à la ruche et qui les additionnent et les modifient vraisemblablement en partie par l'apport de certains de leurs sécrétions propres (cire et sécrétions salivaires essentiellement) (DONADIEU, 1975).

I-3-5-2-2- Les constituants de la propolis :

Les constituants de la propolis sont résumés dans le tableau 03 (DONADIEU, 1975).

Tableau 03 : Les différents constituants de la *propolis*.

Constituants globaux	Constituants identifiés à ce jour
- 50 à 55% de résine et baumes soient environ 2/3.	- Acides organiques : benzoïque et gallique.
- 30 à 40 % de cire.	- Acides phénols : caféique,
- 5 à 10 % d'huiles volatiles ou essentielles	- cinnamique, férulique, isoférulique, p-coumarinique.
- 5 % de pollen.	- Aldéhydes aromatiques : vanilline,
- 5 % de matières diverses.	- isovanilline,
-	- Coumarines : esculétole, scopolétole.
	- De très nombreux : Flavonoïdes .
	- Un grand nombre d'éléments minéraux.
	- Vitamines : pro A, vitamines du groupe B – vit B 3.
	- Constituants divers : le xanthorrhéol, polysaccharides, des acides aminés...

I-3-6-Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes furent découverts en 1936 par le Hongrois Szent-Györgyi dans le zeste de citron (ROULIER, 2003). Elles sont présentes dans la plupart des plantes. Ce sont des pigments polyphénoliques, qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc (MAZOYER et al, 2002), elles se répartissent en quinze familles de composés, dont les plus importantes sont les suivantes : flavones, flavonoles, flavonones, flavannonols, isoflavones, isoflavannones, chalcones, anones, anthocyanes, ces diverses substances se rencontrent à la fois sous la forme libre ou sous la forme de glycosides (ROULIER, 2003).

I-3-6-1-Les propriétés des flavonoïdes:

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. C'est le rôle attracteur pour la pollinisation et la dissémination

des graines (ROULIER, 2003) en plus, les flavonoïdes présentent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant de manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Elle jouent également un rôle de phyto-alexines (DARCY-VRILLON, 2003) (synthèse accrue en réponse à des attaques champignons, insectes,...) (BULEON et al, 2004).

I-3-6-2- Activités pharmacologiques des flavonoïdes :

De nos jours, les activités pharmacologiques des flavonoïdes sont largement étudiées, elles jouent un rôle important dans le domaine médical. Plusieurs recherches sont effectuées d'autres sont en cours (BULEON et al, 2004).

I-3-6-2-1- Activité antioxydante :

Les flavonoïdes agissent contre les radicaux libres, captants ou déterminants les particules dangereuses pour la santé des cellules (l'excès de radicaux libres et considéré aujourd'hui comme une des cause du cancer). Certains flavonoïdes sont utilisés comme anti-oxydants pour la conservation des huiles comestibles (BULEON et al, 2004).

I-3-6-2-2- Activité antitumorale :

Il est bien difficile, à l'heure actuelle, malgré la multiplicité des études, d'évaluer la part des flavonoïdes dans la prévention des pathologies majeures tel que le cancer. Les flavonoïdes réduisent l'apparition de tumeurs dans les études de cancérologie, notamment pour les cancers de la peau, du colon et du sein. Leurs impacts se situent au niveaux du processus de carcinogénèse. Au niveau de la phase d'initiation : ils empêchent le dénaturation au niveau de l'ADN, au niveau de la phase de promotion: en inhibant la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses, puis en phase de progression : en inhibant la vascularisation des tumeurs (BOULKOUR, 2004).

I-3-6-2-3- Activité anti-inflammatoire :

Les flavonoïdes ont une propriété anti-inflammatoire grâce à leur capacité de réagir contre les histamines et d'autres médiateurs d'inflammations (HAVSTEEN, 1983).

I-3-6-2-4- Activité anti-diabétique :

Les polyphénols peuvent améliorer la sécrétion de l'insuline et protègent les cellules pancréatiques qui peuvent être endommagées par les radicaux libres (HERTOG, 1997).

I-3-6-2-5- Autres activités :

Les flavonoïdes ont une propriété "vitaminique p", ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance et ils peuvent être anti-allergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiant, diurétiques, antibactériens, antiviraux et des inhibiteurs enzymatiques (BRUNETON, 1993), ainsi que les isoflavones à

effets oestrogéniques sont efficaces dans le traitement des troubles liés à la ménopause (MAZOYER, 2002), en plus, ils luttent contre l'altération des fibres de collagène, ralentissant de ce fait leur vieillissement (ROULIER, 2003).

I-3-6-3- Les flavonoïdes contre les radicaux libres :

Le secret des effets bénéfiques des légumes et fruits réside dans la présence de Flavonoïdes spécifiques, ces pigments participent à la lutte contre les radicaux libres, substances dont l'excès prédispose à la dégénérescence cellulaire (ROULIER, 2003).

Il est aujourd'hui unanimement reconnu que la consommation de nutriments antioxydants joue un rôle "protecteur", aussi bien au niveau de l'ADN que de la membrane de nos cellules, vis-à-vis des attaques des radicaux libres (ROULIER, 2003). Certains Flavonoïdes, sont de bons antioxydants, capables de protéger contre les effets néfastes des entités radicalaires oxygénées (DARCY-VRILLON, 2003).

I-3-7- Propriétés et activités biologiques des polyphénols :

Les composés phénoliques sont dotés de certaines activités résumées dans le tableau 04.

Tableau 04 : Propriétés et activités biologiques des polyphénols (BAHORUM, 1994).

Polyphénols	Activités
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et antiedémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaro-vieneuse
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes

I-3-8- Propriétés chimiques des polyphénols :

I-3-8-1- Coupure homolytique :

L'oxydation de l'ion phénate est aisée et conduit à un radical phénoxy (Schéma 07), stabilisé par la possibilité de résonance et très réactif. Cette oxydabilité a des conséquences pratiques (propriétés antioxydantes piégeage des radicaux libres) (BRUNETON, 1999).

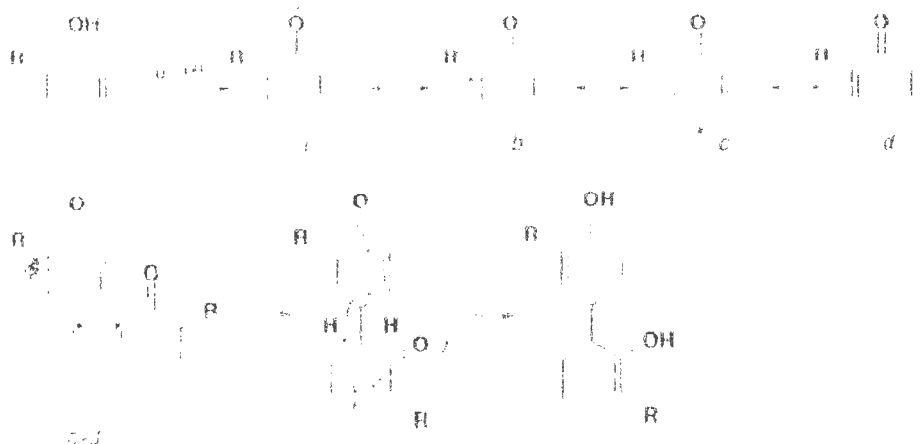


Schéma 07 : Formation du radical phénoxy, mésomérie

Exemple de couplage oxydatif (BRUNETON, 1999).

I-3-8-2- Oxydation du noyau aromatique :

L'oxydation des phénols est une réaction fréquemment rencontrée au cours des processus biosynthétique. Elle peut conduire à un clivage du cycle aromatique ou à une hydroxylation de celui-ci (BRUNETON, 1999) (Schéma 08) (BRUNETON, 1999).

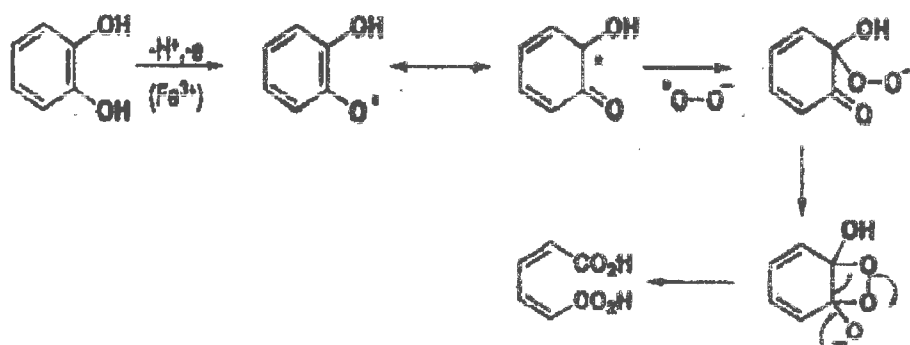


Schéma 08 : Oxydation des phénols. Ouverture du cycle catalysée par dioxygénase.

I-3-9- La biodisponibilité des polyphénols :

Une meilleure connaissance de la biodisponibilité des polyphénols est indispensable pour mieux comprendre leurs effets protecteurs sur la santé.

Leur absorption intestinale peut être excessivement variable (SCALBERT et al, 2000), elle dépend de leurs degrés de glycosylation (HOLLMAN et al. 1995).

Une fois absorbés, les polyphénols ne sont jamais présents sous leurs formes natives végétales, mais toujours sous formes glycosylées et conjuguées avec divers groupement : méthyle, sulfate, glucuronique (MANACH et al. 1996).

Ces réactions de conjugaison modifient la réactivité des polyphénols et facilitent leurs éliminations par voie biliaire ou urinaire. Une partie des polyphénols excrétés par voie biliaire est réabsorbée et alimente un cycle entéro-hépatique qui active relativement les polyphénols (LAIRON, 2000).

I-4-Cancer et chimiothérapie anticancéreuse :

I-4-1- Le cancer :

I-4-1-1- Définition :

La cellule cancéreuse est une cellule anarchique qui n'obéit pas aux régulations normales, une cellule immature et immortelle (YAKER, 1985). Lorsque le *néoplasme* est localisé et ne possède pas les caractéristiques d'invasivité ou de métastase, il est dit *bénin* ; dans le cas contraire on parle de néoplasme malin ou de cancer. La chimiothérapie cytotoxique ne s'adresse qu'à ce dernier cas (LECHAT, 2006). Le cancer est ainsi une maladie « sauvage » qui détruit le tissu qu'il envahit , jette à distance des métastases qui , à leur tour détruit les tissus lointains , altère les fonctions les plus diverses et finit par tuer par destruction locale , des colonies lointaines , désordre général (YAKER,1985).

I-4-1-2- Diagnostic :

A la suite de l'examen clinique d'un patient, la découverte de certains signes particuliers ou l'existence de « signes dits d'altère » doit orienter vers la recherche d'une formation tumorale. Une telle recherche impose des examens : radiologiques, scintigraphiques, endoscopiques et/ou biologiques dont les indications judicieusement posées doivent permettre de situer le siège et la nature de tumeur, d'en préciser l'extension, d'établir un pronostic et d'élaborer un protocole thérapeutique (YAKER, 1985).

I-4-1-3-Traitement du cancer :

Ils sont au nombre de cinq : incluant la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie et l'hormonothérapie.

I-4-1-3-1-La chirurgie :

Est le traitement le plus ancien et le plus connu des tumeurs solides. Elle constitue le traitement par excellence du cancer (ANDRIEU, 1987). Le traitement chirurgical peut avoir pour objectif soit l'éradication de la tumeur (traitement curatif), soit la réduction du volume tumoral (YAKER, 1985).

I-4 -1-3-2-La radiothérapie :

Les rayonnements utilisés sont des photons à haute énergie (rayon X ou rayons Gamma), des électrons ou des neutrons, ces derniers ayant peut-être un effet biologique plus important sur les cellules cancéreuses que sur les cellules normales (FOA et al, 1985). Pour le but d'obtenir la mort de la cellule cancéreuse et de ses descendances par irradiation en évitant de détruire les cellules des tissus sains environnantes (BOULKOUR, 2004).

I-4-1-3-3-La chimiothérapie :

La chimiothérapie constitue le traitement médicamenteux du cancer. Cette thérapeutique, qui connaît des progrès de plus en plus marqués, utilise des substances cytotoxiques grâce à elles, des résultats très encourageants ont été déjà obtenus dans le traitement du cancer (YAKER, 1985).

I-4-1-3-5-L'immunothérapie :

L'immunothérapie constitue un traitement susceptible de compléter la destruction d'une formation tumorale cancéreuse résiduelle post chimiothérapie (FOA et al, 1985).

I-4-1-3-4- L'hormonothérapie :

Le traitement hormonal repose sur la notion d'hormonodépendance qui a été observée dans le développement et l'évolution de certaines tumeurs (FOA et al, 1985).

I-4-2- La chimiothérapie anticancéreuse :**I-4-2-1- Définition des anticancéreux :**

Les agents cytotoxiques sont des substances capables de détruire les cellules cancéreuses tout en préservant dans une certaine mesure les cellules normales à développement rapide (cellules sanguines, cellules épithéliales du tube digestif).

Ils agissent sur les différents stades de la multiplication cellulaire en interférant avec la synthèse des ribonucléiques et désoxyribonucléiques, ou en bloquant les mécanismes de la division cellulaire.

Malheureusement, les chercheurs ne sont pas à ce jour capables de localiser des caractéristiques particulières des cellules malignes, qui les rendraient précisément identifiables (TRAMER, 1992), donc ont des effets secondaires puissants sur la fonction hématopoïétique sur les défenses immunitaires, sur l'embryon, sur les fonctions hépatiques, rénales et cardiaques (COHEN, 1997).

I-4-2-2-La polychimiothérapie :

L'association de médicaments anticancéreux permet d'augmenter la fréquence, l'importance et la durée des réponses. La définition d'une association de médicaments anticancéreux se fonde sur l'amélioration de l'index thérapeutique par rapport à la mono

chimiothérapie. C'est-à-dire sur un gain en terme d'efficacité sans majoration trop importante de la toxicité.

Les associations chimiothérapeutiques ne sont utilisables en clinique qu'en absence de majoration excessive des effets indésirables (ESPIE et al, 1992), pour but d'améliorer l'efficacité du traitement anticancéreux on fait l'association des anti-tumoraux dont le mécanisme d'action est différent (par exemple les anthracyclines et les Vinca-alcaloïdes), (COHEN, 1997).

I-4-2-3- Classification des cytotoxiques selon leur action dans le cycle cellulaire :

La plupart des substances cytotoxiques n'affectent que la propriété proliférative des cellules cancéreuses. Ces traitements n'ont aucun effet direct sur les propriétés d'invasivité, de dédifférenciation ou de métastases (LECHAT, 2006).

Ces substances agissent sur les cellules tumorales en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle celles-ci se trouvent :

- soit sur les cellules quelque soit leur phase y compris la phase Go (drogues cyclo-indépendantes).
- Soit sur les cellules situées dans leur phase, à l'exclusion de la phase Go.
- Soit sur les cellules situées dans une phase, en épargnant les cellules se trouvant dans les autres phases (YAKER, 1985), (schéma 09

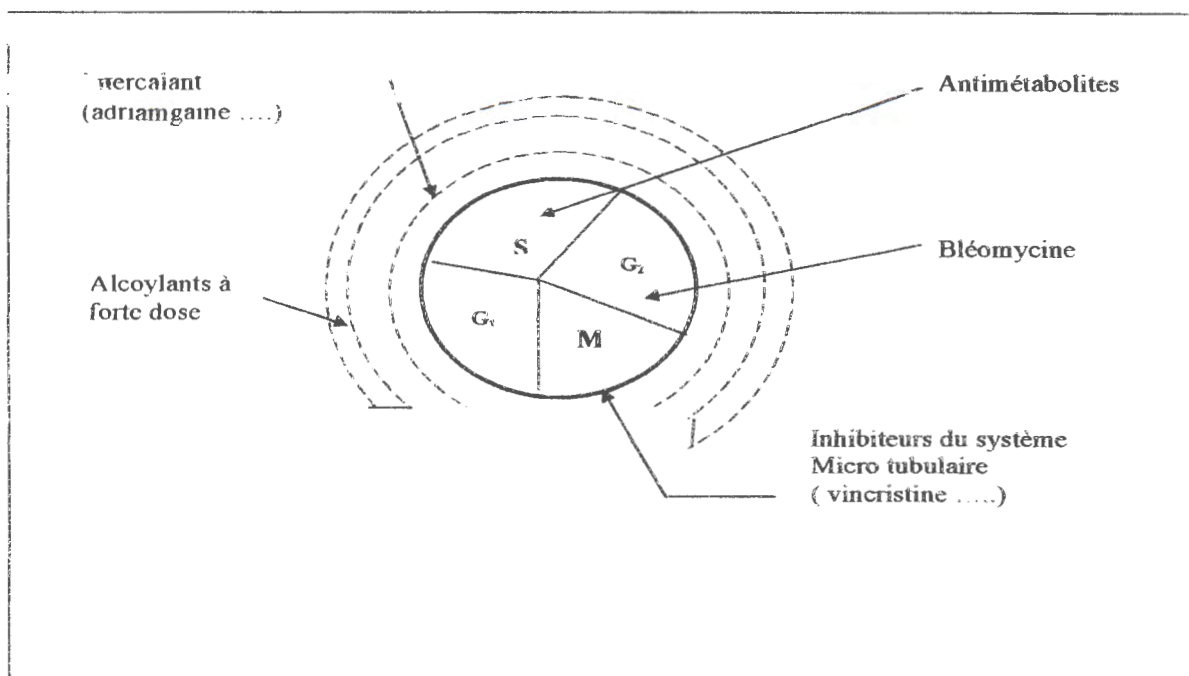


Schéma 09 : Schéma simplifié d'action de quelques médicaments ou catégories de médicaments anticancéreux en fonction du cycle cellulaire (LECHAT et al, 1992).

I-4-2-4- Mécanismes généraux de l'action cytotoxique :

Pour la très grande majorité des agents anticancéreux cytotoxiques, c'est une interaction directe ou indirecte avec l'ADN qui sera responsable de la mort cellulaire (schéma 10).

Interaction directe avec l'ADN par :

- Alkylation : un agent capable de remplacer un proton d'une molécule par un groupement alkyle est un agent alkylant.
- Intercalation : est le phénomène au cours duquel une molécule polycyclique plane « se glisse » entre les plateaux qui constituent deux paires de bases contiguës de l'ADN entraînant ainsi une désérialisation de l'ADN : les Anthracyclines.
- Agent scindant l'ADN : Bléomycine.
- Génération des radicaux libres : De nombreux agents anticancéreux par ailleurs alkylants ou intercalent (Mitomycine, Anthracyclines,...) peuvent lors de leur métabolisme intracellulaire, engendrer des radicaux libres.

Interaction indirecte avec l'ADN par :

- Interaction avec la topoisomérase II.
- Agent tubulo affines : alcaloïde de la pervenche comme la Vinblastine (YAKER, 1985).

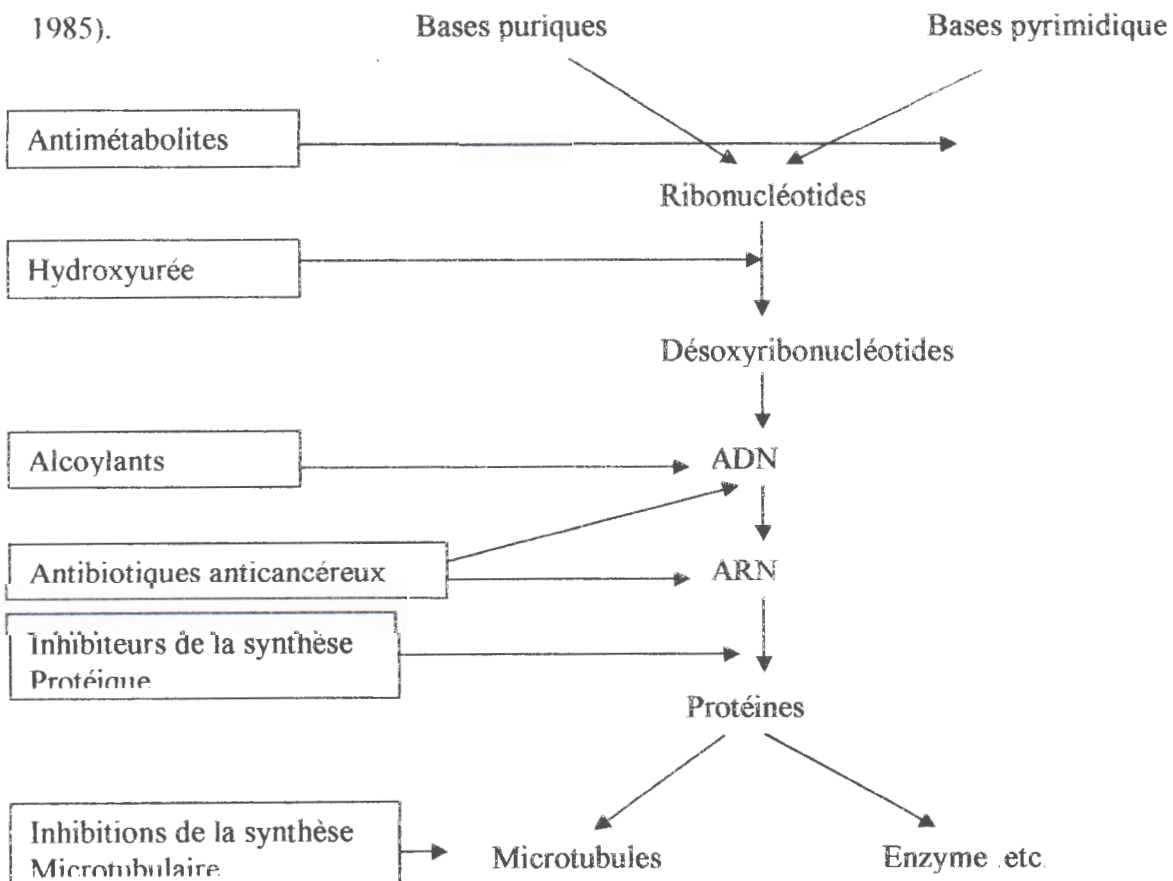


Schéma 10 : schéma général d'action des médicaments anticancéreux (LECHAT et al ,1992).

I-4-2-5- Classification des médicaments anticancéreux :

Les anticancéreux peuvent être classés en fonction de leur attaque du cycle cellulaire en six groupes :

1. Les agents alkylants qui entravent la duplication de l'ADN cellulaire grâce à des fonctions « alcoyles » qui sont des sites au vides d'électrons : moutardés à l'azote.
2. Les antimétabolites qui empêchent la production d'ADN par leur structure très proche des acides nucléiques.
3. Les antibiotiques qui ont une structure et une action « intercalente » complexe : Epirubicine.
4. Les poisons du fuseau sont des extraits de plantes qui bloquent l'appareil mitotique. Ils sont donc « antimitotique » au sens strict du terme : Vinblastine
5. La L-asparginase (Kidrolase) est un produit qui mérite l'individualisation par son action enzymatique sélective.
6. D'autres produits sont apparus récemment et ne peuvent être classés en raison de mécanismes d'actions complexes (FOA et al, 1985). (Tableau 05)

Tableau 05 : Classification des substances anticancéreuses (LAHOUEL, 1985).

Familles	Médicaments	Mécanisme d'action principal
Antibiotiques	Actionomycine D Doxorubicine Daunomycine	Fixation sur l'ADN en empêchant le fonctionnement de l'ADN polymérase et ARN polymérase
Alkylants	Cyclophosphamide Busulfan : CCNU.CNU	Fixation sur l'ADN en empêchant une impossibilité de la réplication
Antimétabolites	6- mercaptopurine Méthotrexate Cytosine arabinoside	Empêchant la synthèse des purines en bloquant la synthèse de deoxycytidine
Poisons du Fuseau	Vincristine Vinblastine	Inhibition de la transcription à la dernière phase du cycle cellulaire.
Agents divers	Hydroxyurée	Inhibition de la synthèse des nucléotides

I-4-2-6- Les effets secondaires des substances cytotoxiques :

Les anticancéreux s'attaquent aux cellules en division rapide, leur spécificité à l'égard des cellules cancéreuses n'est pas totale, de ce fait ces substances s'attaquent aussi aux tissus dont les tissus se renouvellent rapidement (COHEN, 1997).

Ces effets indésirables sont souvent importants, bien qu'il soit possible de les prévenir ou de les atténuer par des mesures préventives ou curatives adaptées (TALBERT et al. 1998).

I-4-2-6-1-La toxicité hépatique :

Plusieurs cas d'hépatotoxicité ont été rapportés chez l'homme après le traitement par les molécules anticancéreuses (BOULKOUR, 2004), des cytolyses hépatiques et digestives sont par fois observées; telle que l'hépatotoxicité due au traitement par le nitrosourée CCNU (VIOTE et al, 1986). Cependant le foie joue un rôle essentiel dans le métabolisme de la plupart des médicaments (BENHAMOU , 1986) , ainsi le Paracétamol et les Cyclophosphamides sont transformés dans le foie par le cytochrome P₄₅₀ ; les métabolites réactifs ainsi formés sont responsables d'une déplétion en glutathion et d'une lipoperoxydation hépatocytaire , la Vinblastine est un médicament anticancéreux également hépatotoxique et hématotoxique (LAHOUEL , 2004) .

I-4-2-6-2- Les autres effets secondaires :

Il sont nombreux et touchent presque tous les organes : le cœur , les gonades , la peau et les muqueuses , le fœtus , les poumon , des atteintes neurologiques , hématologiques ,rénales ,la chute du cheveux , la diminution de la résistance aux infections microbiennes (COHEN , 1997) .

I-4-2-7- Epirubicine :

C'est un antibiotique antinéoplasique de la classe des Anthracyclines, c'est une antracycline du deuxième génération isolée en 1975 et développée pour réduire les complications cardiaques de la Doxorubicine commercialisée sous le nom Formorubicine[®] (DIJON, 1997).

I-4-2-7-1- La structure chimique : voir le schéma si dessous :

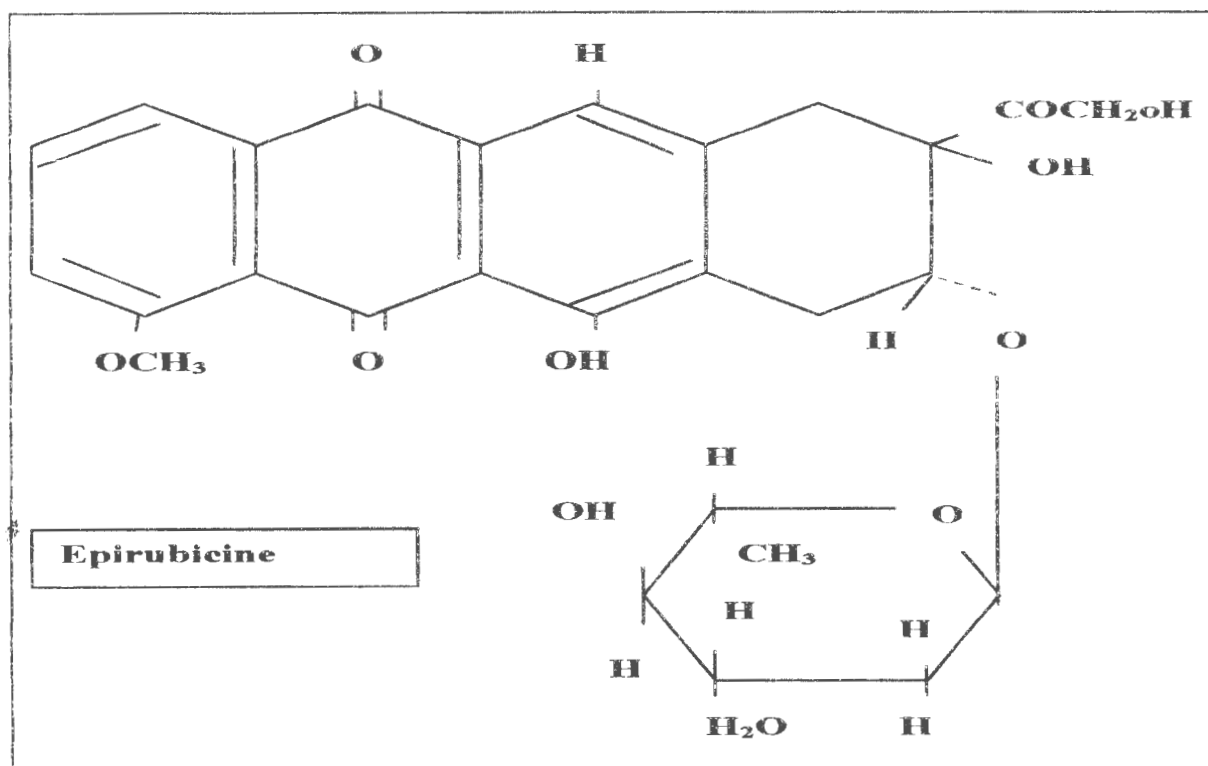


Schéma 11 : La structure chimique de l'Epirubicine (ESPIE et al, 1992).

I-4-2-7-2- Indications :

- Carcinomes mammaires
- Cancer de l'ovaire.
- Lymphomes malignes non hodgkiniens, maladie de hodgkin.
- Cancer micro- cellulaires du poumon.
- Sarcomes des parties molles.
- Cancers de l'œsophage, de l'estomac, du pancréas, cancers hépatocellulaires.
- Cancers épidermoïdes de la sphère otorhinolaryngologique (VIDAL, 2000).

I-4-2-7-3- Posologie et mode d'administration :

- Les doses usuelles sont de 50 à 75 mg / m² toutes les 3 à 4 semaines.
- L'Epirubicine est injecté dans une veine pendant quelques minutes (ESPIE et al, 1992).

I-4-2-7-4- mécanisme d'action :

Le mode d'action est celui des intercalants. Il se lie à l'ADN et inhibe l'action des polymérase des acides nucléiques. L'insertion entre les deux brins d'ADN inhibe la transcription en G₁, G₂ et la répllication en phase S (DIJON, 1997).

Inhibe la topoisomérase II : enzyme impliquée dans le déroulement de la double chaîne d'ADN lors de sa réplication (TREAT, 1983), la formation des radicaux libres et des lésions membranaires (DIJON, 1997).

I-4-2-7-5- la pharmacocinétique : (VIDAL, 2002, CAPPELEARE, 2002)

I-4-2-7-5-1- Absorption : non résorbé par voie orale, administré exclusivement par voie intraveineuse.

I-4-2-7-5-2- Répartition :

Importante diffusion tissulaire, augmentation de l'aire sous la courbe et diminution de la clairance, plasmatique en cas de métastase hépatique.

I-4-2-7-5-3- Demi-vie, taux plasmatique et élimination :

- Demi vie = 35 heures .
- La concentration plasmatique décroît de façon tri-exponentielle : une phase très rapide ($t_{1/2}$ inférieur à 2 heures) , phase plus lente ($T_{1/2}$: 2 à 8 heures) et une phase très lente ($T_{1/2}$ 30 à 40 heures).
- Élimination : voie rénale : 10 à 15 % de la dose administrée est retrouvée dans les urines en 7 jours
- Voie biliaire : voie principale de l'élimination.

I-4-2-8- La Vinblastine :

Découverte en 1957 , le velbé est un alcaloïde de la pervenche qui a une action spécifique sur la mitose (DIJON , 1997) la molécule de la Vinblastine a une structure dimérique unissant un noyau catharanthine ($C_{21}H_{24}N_2O_2$) avec un noyau vindoline ($C_{25}H_{23}N_2O_6$) par deux atomes de carbone (CAPPELEARE, 2002).

I-4-2-8-1- La structure chimique : voir le schéma si dessous.

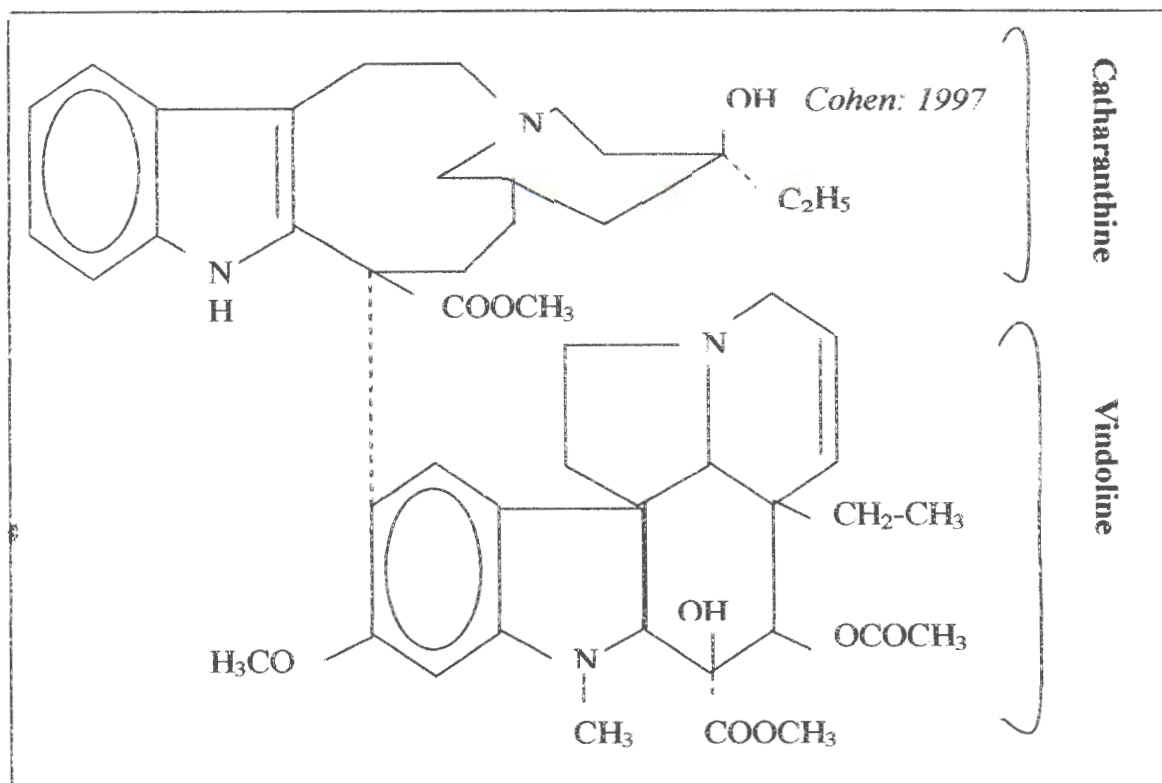


Schéma 12 : la structure chimique de la Vinblastine (COHEN, 1997).

I-4-2-8-2- Indications :

- Maladie de hodgkin et lymphome non hodgkinien.
- Cancer du testicule, l'ovaire, sein, vessie.
- Sarcome de Kaposi, choriocarcinomes.
- Certains cas d'histiocytose (VIDAL, 2002).

I-4-2-8-3- Posologie et mode d'administration :

- La dose habituelle est de 6 à 8 mg/m².
- La Vinblastine est souvent prise en association avec d'autres médicaments elle est à injecter dans une veine (CAPPELEARE, 2002).

I-4-2-8-4- Mécanisme d'action :

La Vinblastine est un agent anti- microtubulaire qui se fixe sur les sous unité β de la tubuline à un site différent de celui de la Colchicine. La Vinblastine est active sur les cellules qui sont engagées dans le cycle cellulaire, les bloque en G₂ / M et provoque l'apoptose (CAPPELEARE, 2002).

Elle agit aussi sur les acides nucléiques avec inhibition de la synthèse de l'ARN soluble. Il existe aussi une interférence dans les voies métaboliques des acides aminés qui conduisent de l'acide glutamique à l'acide citrique et à l'urée (DIJON, 1997).

I-4-2-8-5- La pharmacocinétique :**I-4-2-8-5-1- Absorption :**

Les alcaloïdes de la pervenche ne sont pas absorbés par voie digestive, la Vinblastine s'administre par voie intraveineuse stricte (CAPPELEARE ,2002).

I-4-2-8-5-2- Répartition :

Le produit ne franchit pas la barrière méningée (VIDAL, 2002).

I-4-2-8-5-3- Demi- vie, taux plasmatique et élimination :

- Demi- vie d'élimination : 24 à 30 h
- Après injection intraveineuse d'une dose de 4 à 7 mg/m², la disparition du Velbé du plasma est tri phasique avec trois demi- vies d'élimination (0.074 h, 1.74 h ,28.8 h).
- Forte liaison aux protéines plasmatique; la clairance plasmatique est de 0,865.
- L'élimination est essentiellement biliaire : 70% dans les selles et 15% dans les urines (DIJON, 1997).

Chapitre II
Matériel et méthodes

II- Matériel et méthodes :

II-1- Matériel :

II-1-1- Les animaux :

II-1-1-1- Entretien des animaux :

Notre étude a été effectuée sur des rats femelles « Wistar » de souche « albinos » provenant de l'institut Pasteur d'Alger, pesants environ 150g comme moyenne. Ces animaux sont élevés pendant notre étude dans des cages en plastique, ayant libre accès à l'eau et à la nourriture « croquette ». L'animalerie est soumise à une photopériode de 15/24 heures et maintenue à une température entre 20 et 27°C avec une légère ventilation.

II-1-1-2- Traitement des animaux :

09 rats sont utilisés pour notre étude et répartis en 03 lots :

Lot n°=1 : témoin (02 rats) qui ne reçoivent rien.

Lot n°=2 : traite (04 rats) qui reçoivent les deux médicaments, la Vinblastine (1mg / kg), l'Épirubicine (1,60mg / kg).

Lot n°=3 : Prétraité (03 rats) qui reçoivent l'extrait de la *propolis* (100mg/kg) - un traitement préventif – pendant 10 jours, avant l'administration des deux médicaments anticancéreux : Vinblastine (1 mg / kg) et Épirubicine (1,60 mg / kg), dans une seule dose thérapeutique pour le lot traité (lot n°=3).

II-1-2- La propolis :

Nous avons utilisé la *propolis* brute déjà extraite par les étudiants de Magister, dans le laboratoire de recherche scientifique de pharmacologie et phytochimie de l'université de Jijel

Ils suivent le protocole d'extraction suivant :

Ils ont procédé à l'extraction des substances bioactives et à leurs purifications (le solvant utilisé est de l'éthanol). La quantité de la *propolis* additionnée à dix volumes de solvant de son poids (pour 1g de *propolis* ils ajoutent 10ml de solvant), la *propolis* brute est coupée en petits morceaux et mise dans un récipient. Si elle est trop molle elle est placée au réfrigérateur pendant quelques heures puis coupée, par la suite elle est additionnée de dix volumes de son poids d'éthanol à 95% puis laissée pour macération pendant 15 jours, avec agitation de temps en temps.

Le mélange est filtré sur papier filtre ou de coton. (dix fois) en suite, le filtrat est évaporé en utilisant un évaporateur de type rotatif. Cet extrait est conservé dans des bocaux fermés hermétiquement et placé dans un endroit à l'abri de la lumière et la chaleur, (Schéma, 13).

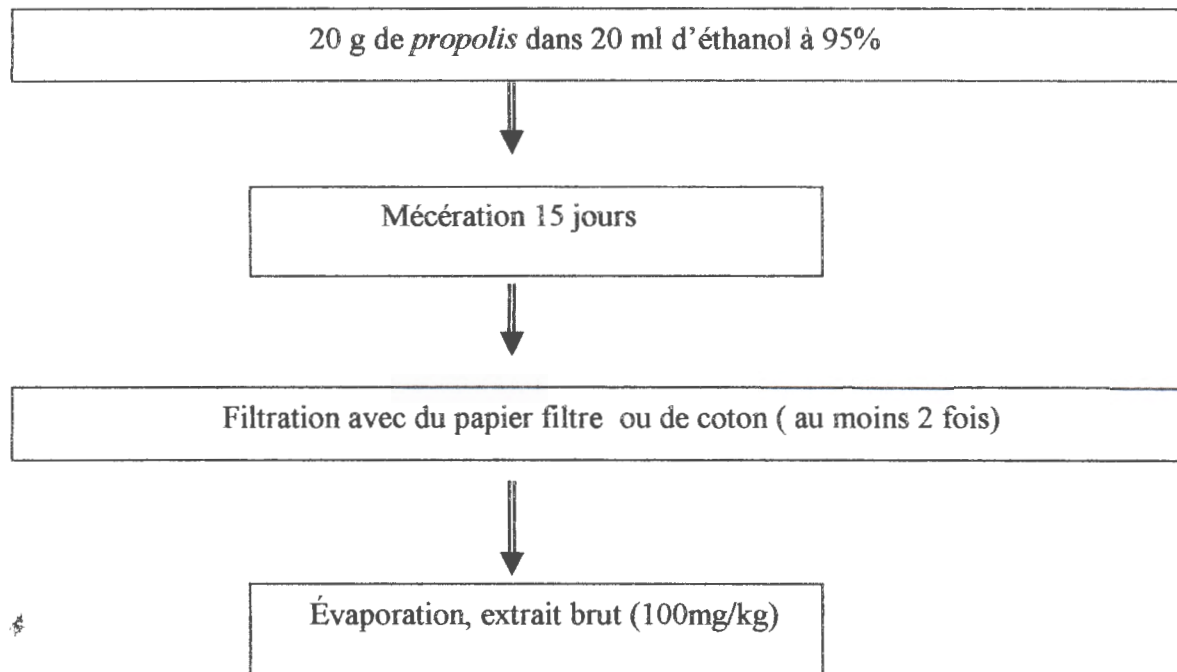


Schéma 13 : Protocole d'extraction des principes actifs de la *propolis*.

II-2- Méthodes :

II-2-1- Préparation des solutions administrées :

II-2-1-1- La solution de l'extrait de la *propolis* :

On prend 0.2 ml de l'extrait de la *propolis*, et on le dissout dans 1 ml d'alcool (éthanol) et 8.8 ml d'eau distillée avec une agitation pour bien dissoudre.

- Calcul du volume administré :

1 ml de la solution de la *propolis* → 200 g (poids du rat).

$$V_1 \text{ ml} \rightarrow 150 \text{ g}$$

$$V_1 = 0.75 \text{ ml.}$$

Donc pour un rat de 150 g, le volume administré est de 0.75 ml.

II-2-1-2- Les solutions médicamenteuses :

II-2-1-2-1- La Vinblastine :

D'abord il faut calculer la dose thérapeutique du médicament « Vinblastine » administrée à un rat moyen de 150 g.

-Calcul de la dose administrée par rat : (150 g)

$$1 \text{ mg de Vinblastine} \rightarrow 1000 \text{ g (poids)}$$

$$X_2 \text{ mg} \rightarrow 150 \text{ g (rat)}$$

$$X_2 = 0.15 \text{ mg -rat.}$$

Chaque rat reçoit 0.15 mg de la Vinblastine.

-Préparation de la solution médicamenteuse :

$$0,15 \text{ mg Vinblastine} \rightarrow 0.15 \text{ ml} = V_2$$

$$10 \text{ mg} \rightarrow V$$

$$V = 33,33 \text{ ml}$$

Donc on dissout 10 mg de la Vinblastine dans 33.33 ml d'eau distillée puis on administre 0,5 ml de la solution mère pour chaque rat.

II-2-1-2-2- L'Épirubicine :

La dose thérapeutique de l'Épirubicine est de 60 mg / m².

Il faut calculer le volume à administrer correspondant à cette dose.

- Calcul de la surface pour un rat de 150 g :

Un homme de 70 kg à une surface de 1,87 m².

$$70 \text{ kg} \rightarrow 1,87 \text{ m}^2$$

$$0.150 \text{ kg (rat)} \rightarrow Y_1$$

$$Y_1 = 0,004 \text{ m}^2$$

La surface d'un rat de 150 g rat égale 0,004 m².

- Calcul de la masse du médicament correspondant :

$$60 \text{ mg épirubicine} \rightarrow 1 \text{ m}^2$$

$$Y_2 \text{ mg} \rightarrow 0.004 \text{ m}^2$$

$$Y_2 = 0,24 \text{ mg.}$$

Chaque rat reçoit 0.24 mg d'Épirubicine.

- Préparation de la solution mère :

Le médicament est dilué dans le NaCl 9‰

- Préparation du NaCl 9 ‰

$$9 \text{ g de NaCl} \rightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$Y_3 \text{ de NaCl} \rightarrow 5 \text{ ml}$$

$$Y_3 = 0.045 \text{ g}$$

Pour préparer 5 ml de NaCl 9‰ il faut 0.045 g de la poudre.

- Préparation de la solution médicamenteuse :

$$10 \text{ mg d'épirubicine} \rightarrow 5 \text{ ml de NaCl 9 ‰}$$

$$Y_4 \rightarrow 1 \text{ ml}$$

$$Y_4 = 2 \text{ mg.}$$

Donc les concentrations de la solution médicamenteuse égalent à 2 mg/ml.

- **Calcul du volume administré :**

$$2 \text{ mg d'Épirubicine} \rightarrow 1 \text{ ml NaCl } 9\%$$

$$0.24 \text{ mg} \rightarrow V_3 \text{ ml}$$

$$V_3 = 0.12 \text{ ml.}$$

Chaque rat reçoit 0.12 ml d'Épirubicine qui correspond à 0.24 mg.

- Les administrations effectuées pour un rat de 150 g sont :
- V_1 de la solution de **propolis** = 0.75 ml.
- V_2 de la solution de **Vinblastine** (1 mg /kg) = 0.5 ml.
- V_3 de la solution de l'**Épirubicine** (1,60 mg /kg) = 0.12 ml.

II-2-2- Voies d'administration des différents solutions :

II-2-2-1- Par gavage gastrique :

La solution polyphénolique est administrée par gavage gastrique selon la méthode suivante : la nuque du rat a été fixée par l'index et le pouce de façon à tenir la peau du rat dans la paume de la main gauche, l'administration s'effectue par la main droite qui porte la seringue munie d'une sonde métallique, cette dernière applique une pression sur la base de la langue pour assurer une ouverture bucco – pharyngienne et permettre sa pénétration dans l'œsophage.

II-2-2-2- Par voie intraveineuse :

Les deux médicaments sont administrés par la voie intraveineuse au niveau de la veine caudale, cette dernière est imbibée dans l'eau tiède pour assurer la dilatation des vaisseaux sanguins et faciliter l'administration qui s'effectue par une seringue .

II-2-3- Les prélèvements :

II-2-3-1- Prélèvement de sang :

Le sang est prélevé par ponction à l'aide d'un cathéter hématocrite « tube à hématocrite » le bout est introduit délicatement au niveau rétro-orbitaire dans le sinus carvéneux riche en sang, le sang monte alors par capillarité et sera récupéré dans des tubes secs.

En suite , le sang est centrifugé à 3500 tour/min pendant 10 mn , les sérums obtenus soit serviront directement, soit conservés dans des épindroffes à froid.

Le sang est prélevé à intervalle régulier [0, 7, 14, 21] après le traitement par les anticancéreux (Photo, 01)

II-2-3-2- Prélèvement de l'organe « le foie » :

Le sacrifice s'effectue à intervalle régulier [0, 7, 14, 21] après le traitement par les anticancéreux (Photo, 02).

Les dosages s'effectuent soit sur le foie frais ou congelé.



Photo 01 : Méthode du prélèvement sanguin.



Photo 02 : Méthode du prélèvement du foie.

II-2-4- Étude de l'hépatotoxicité :

Dans notre étude de l'hépatotoxicité, nous avons procédé aux dosages du TGP sérique, MDA cytosolique et GSH cytosolique.

- Lieu de dosage : ces dosages ont été réalisés au niveau du laboratoire de toxicologie l'institut de biologie de l'université de Jijel. La lecture s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre de type UV min 1240 SHIMADZU.

II-2-4-1- Évaluation de cytolysé hépatique :

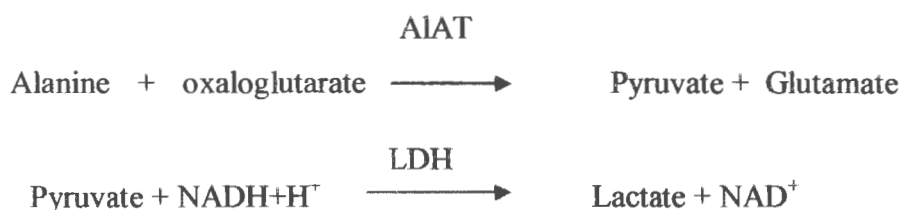
En pratique, les transaminases ou les amidotransférases possèdent le meilleur pouvoir pour déterminer une hépatite quelque soit l'origine (virale, alcoolique, médicamenteuse, surcharge). Le TGP est plus spécifique des affections du foie que le TGO à raison de :

- La localisation à l'intérieur des hépatocytes est différente (TGO localisé dans le cytoplasme et les organites cellulaires, alors que le TGP est localisé en totalité dans le cytoplasme).
- La durée de vie est différente : la durée de vie de TGO est inférieure à celle de TGP (CHAREL, 1991).

II-2-4-1-1- Principe de dosage :

Le dosage des transaminases se fait par méthode colorimétrique.

Le TGP (ALAT) catalyse le transfert du groupement amino de la L-alanine au 2-oxoglutarate, en formant le pyruvate et le glutamate. La concentration catalytique est déterminée en utilisant la réaction couplée de lactate déshydrogénase (LDH) à partir de la vitesse de disparition du NADH, mesurée à 340 nm.



II-2-4-1-2- Composition des réactifs utilisés :

-Réactif A : Tris 150 m mol/L , L-alanine 750 m mol/L ,Lactate déshydrogénase > 1350 U/L , P^H =7,3 .

- **Réactif B** : NADH 1,3 m mol/ L, 2- oxoglutarate 75mmol /L , hydroxyde de sodium 148 m mol /L sodium azide 9,5 g/L .

- **Réactif de travail** : Le réactif de travail est préparé dans les proportions : 4 ml de réactif A plus 1 ml de réactif B, ce réactif est stable 2 mois à $(2-8)^{\circ}\text{C}$.

II-2-4-1-3- Protocole de dosage :

- Analyseur : spectrophotomètre à cuve thermostable à $(30 \text{ ou } 37)^{\circ}\text{C}$.

- La longueur d'onde : 340 nm

- Cuve de 1 cm de trajet optique.

- Le dosage s'effectue sur le plasma ou le sérum.

- Méthode :

- 1. Porter le réactif de travail et l'instrument à la température de la réaction .

- 2. Pipter dans la cuvette. (Tableau 06)

Tableau 06: le volume de l'échantillon et la température correspondante.

Température de réaction	37°C	30°C
Réactif de travail	1,0 ml	1,0 ml
Échantillon	50µl	100 µl

- 3. Mélanger et insérer- la dans la porte cuve thermostatée. Mettre le chronomètre en marche.

- 4. Au bout de 1 minute, notez l'absorbance initiale et effectuez de nouvelles lectures chaque minute pendant 3 minutes.

- 5. Calculer l'accroissement moyen d'absorbance par minute ($\Delta A/\text{min}$) .

- 6. Les calculs : (tableau 07)

Tableau 07 : Les calculs pour chaque température (GELLA et al, 1985).

Température de réaction	37°C	30°C
DA / min	x 3333=U/l x 55,55 µ Kat /L	x 1746=U/l x 29,1=µ Kat /l

II-2-4-2- Évaluation du stress oxydatif :

Le stress induit par les anticancéreux a été évalué par le dosage du MDA et du GSH dans le cytosol des cellules hépatiques.

II-2-4-2-1- Dosage du malondialdéhyde :

A ce jour, le marqueur le plus utilisé pour déterminer un stress oxydatif reste le malondialdéhyde (MDA).

II-2-4-2-1-1- Principe de dosage :

La notion de dosage du malondialdéhyde est substituée à la notion de TBARS « Substances réagissent avec l'acide thiobarbiturique ». La réaction de dosage du malondialdéhyde repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100°C) entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment de couleur rose absorbant à 530 nm extractible par les solvants organiques comme le n- butanol .(LEFEVRE , 2003) ,(schéma 14)

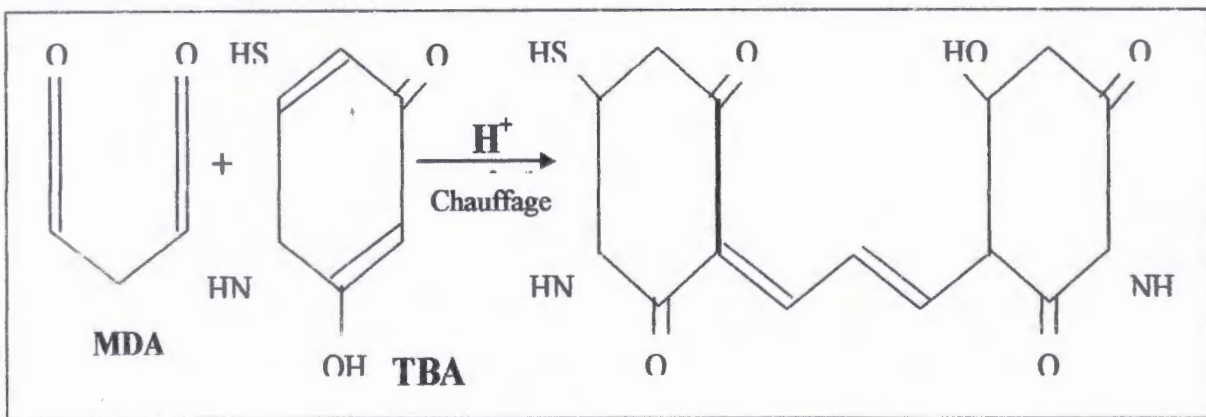


Schéma 14 : Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique (LOGANI et al ,1977)

II-2-4-2-1-2- Les réactifs utilisés : (Voir annexe).

- Solution de KCL : 1 ,15 M.
- Solution de TBA : 0,67% (acide thiobarbiturique).
- Solution de TCA : 20%.
- n – butanol.

II-2-4-2-1-3- Protocole d'évaluation de MDA :

II-2-4-2-1-3-1- Préparation de l'homogénat :

Pour le dosage du MDA nous avons utilisé 1 g de foie additionné à 3 ml de KCl (1.15 m) puis broyage par un homogénéiseur de douce.

II-2-4-2-1-3-2- Étapes de dosage :

Le dosage du MDA est effectué selon le protocole récapitulé dans le (tableau 08) :

Tableau 08 : Étapes de la réalisation de dosage du MDA

Tubes		
Solutions (ml)	Tube blanc	Tube échantillon
Homogénat tissulaire	—	0,5
KCl	0,5	—
TCA	0,5	0,5
TBA	1	1
Incubation dans le bain marie à 100°C pendant 15 minutes, puis refroidissement		
n- butanol	4	4
		Centrifugation de 15 minutes à 3000 tours /minute
La densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm		

Puis on fait la projection des différentes densités optiques obtenues sur la courbe d'étalonnage pour obtenir les concentrations en nanomol du MDA /g de foie.

II-2-4-2-1-4- Réalisation de la courbe d'étalonnage :

Pour réaliser la courbe d'étalonnage on a utilisé pour la dilution le tétraméthoxypropane (les acétals methoxy) de poids moléculaire 164,20g qui est une forme stable qui donne stoechiométriquement en milieu acide du malondialdéhyde, les étalons de tétraméthoxypropane se présentent sous forme d'huiles peu hydrophile à température ambiante (Voir annex). La pureté de notre flacon utiliser est 99% et la molarité est de 6.02 mol/l

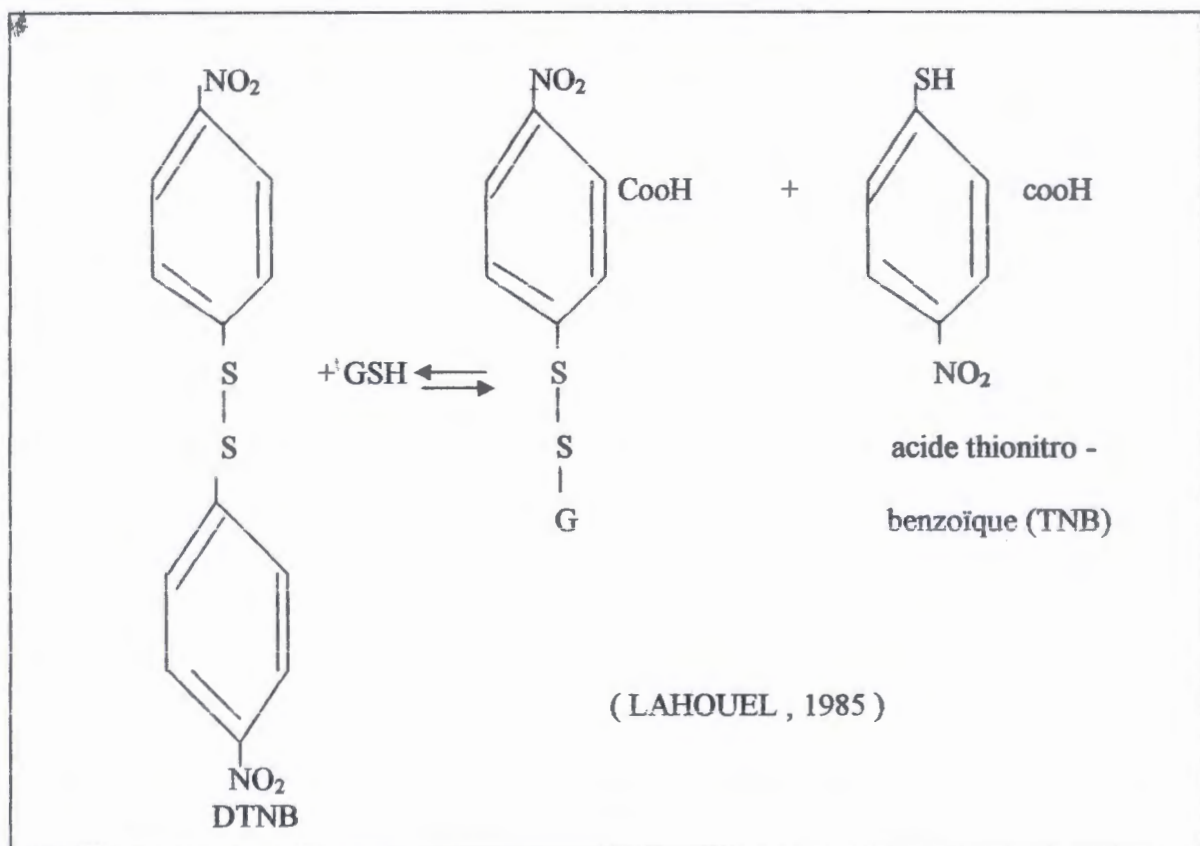
Les dilutions réalisées sont (0,00625 , 0.0125 , 0,025 , 0,05 , 0,1 , 0,12) nmol/l, puis on suit le même protocole de dosage de MDA , la lecture s'effectue à 530 nm sur la phase butanolique .

II-2-4-2-2- Dosage du glutathion :

Le glutathion est le thiol intracellulaire le plus abondant présent dans toutes les cellules animales à des concentrations variables allant de 5 à 10 mM.

II-2-4-2-2-1- Principe de dosage :

Pour le dosage du glutathion, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) est la méthode la plus employée. La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5 Thiobis 2 nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à P^H (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 nm (Schéma, 15).



SCHEMA 15 : Réaction du GSH avec DTNB

II-2-4-2-2-2- Les réactifs utilisés : (Voir annex).

- TCA 5% (acide trichloroacétique).
- Na₂HPO₄ (tampon phosphate) 0,1 M à P^H

- DTNB 10 Mm (5.5 dithiobis 2, nitrobenzoïque acid).

II-2-4-2-2- Protocole de dosage de GSH :

Pour le dosage du GSH, 1g de foie frais ou congelé est homogénéisé dans 3 ml , de TCA 5% (précipitation des protéines) dans l'homogénéiseur de douce, puis la centrifugation à 2000 tours / min pendant 20 minutes .

50 µl de surnageant est diluée dans 10 ml de tampon phosphate 0.1 M à $P^H = 8$, à 3 ml de ce mélange. 20 µl de DTNB 10 mM sont additionnés, une couleur jaune se développe 3 minutes après l'addition du DTNB.

La lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec du TCA 5%

Les concentrations sont déterminées à partir d'une gamme étalon de GSH et exprimées en mM/g de tissu.

II-2-4-2-2-4- Réalisation de la gamme étalonnage de GSH :

II-2-4-2-2-4-1- Préparation de la solution mère :

Pour préparer la solution de glutathion 10mM. on pèse 3.15 mg de glutathion pour 10 ml d'eau distillée

II-2-4-2-2-4-2- Préparation des dilutions :

A partir de cette solution mère on a effectué avec l'eau distillée les dilutions de (5 . 2.5 . 1.25 . 0)mM.


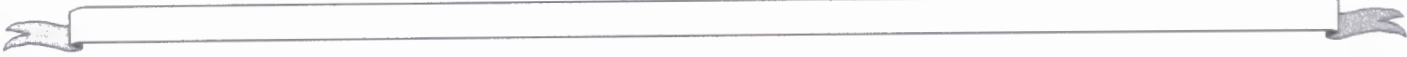
Puis on suit le même protocole de dosage de GSH et la lecture de la densité optique à 412 nm .

II-3- Evaluation statistique :


Les résultats de l'étude sont exprimés en moyenne \pm écart type ($\bar{X} . s$) La comparaison des groupes a été réalisée par le test statistique de Student (t) les valeurs moyenne \pm écart type de chaque groupe sont comparées avec celles du groupe témoin.

Le test est positif aux limites suivantes :

$P > 0.05$ (*) . $0.05 > P > 0.01$ (* *) . $0.01 > P > 0.001$ (* * *) . ns = non significatif.



Chapitre III
Résultats et
interprétations



III- Résultats et interprétation :

III- 1- La mortalité des animaux et les effets indésirables remarqués :

Après le traitement par les deux anticancéreux, Vinblastine (1 mg /kg) et Epirubicine (1,60 mg/ kg) on a enregistré deux cas mortalité dans le lot traité seulement par ces deux médicaments le 6^{ème} et le 7^{ème} jour après le traitement. On n'enregistre aucun cas de mortalité pour les autres lots (le lot témoin et le lot préventivement traité par l'extrait de la *propolis* (100 mg / kg). Chute de cheveux une diarrhée et une nécrose au niveau de la queue du lot traité qui sont des effets indésirables des médicaments.

III- 2^{ème} Résultats et interprétation de l'étude de la toxicité hépatique :

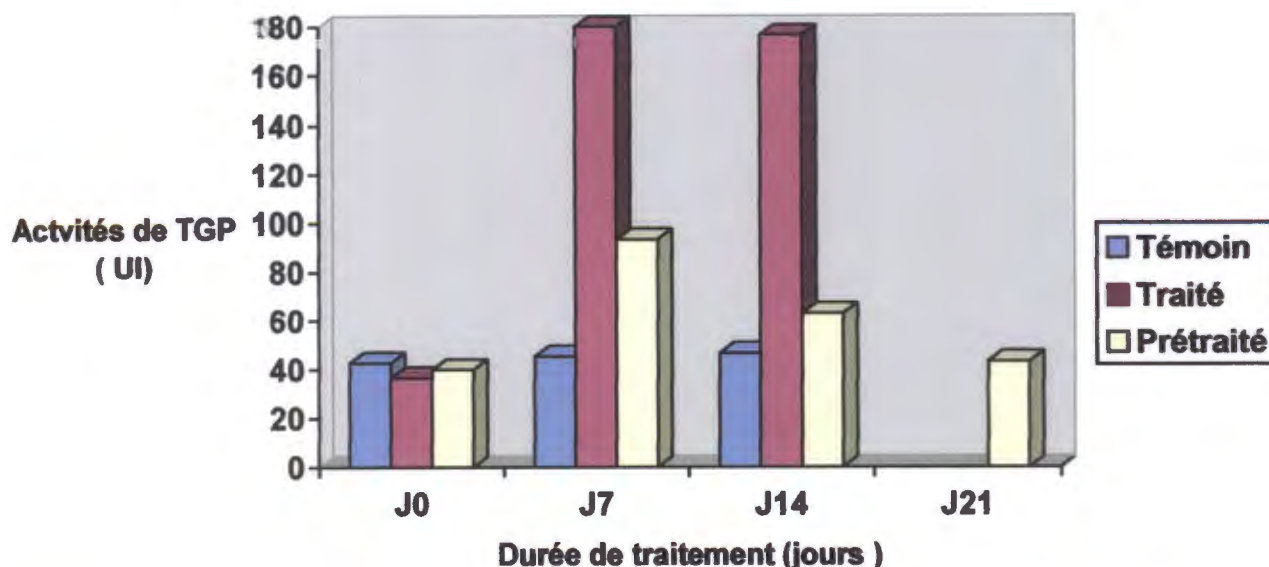
III- 2-1- Le dosage sérique des transaminases (TGP) :

III-2-1-1- Résultats :

Les variations de l'activité des transaminases glutamo-pyruvates (TGP) au cours de traitement par la Vinblastine (1 mg/ kg) et l'Epirubicine (1,60mg / kg) pour le lot traité et par ces deux médicaments anticancéreux associés aux polyphénols (extrait de la *propolis* 100 mg /kg) pour le lot prétraité , sont rassemblées dans le tableau 09 et représentées en histogramme 01 .

Tableau 09 : Évaluation des activités de TGP (UI) après traitement par la Vinblastine (1 mg /kg) et l'Epirubicine (1,60 mg/ kg) seuls ou associés à la *propolis* (100 mg / kg).

Durée de traitement (jours) / Traitement	J ₀	J ₇	J ₁₄	J ₂₁
Le lot témoin (n=2)	42.82 ± 0.71	45.36	46.66	—
Le lot traité par la Vinblastine (1 mg/kg) et L'Epirubicine (1.60mg / kg) (n=4)	36.66	*** 179.98 ± 4.73	*** 176.54	—
Le lot prétraité : la Vinblastine (1 mg /kg) et L'Epirubicine (1.60 mg / kg) Extrait de la <i>propolis</i> (100 mg/kg) (n=3)	39.99± 37.7	93.32 ± 4.24	63.32	43.32



Histogramme 0 1 : La variation de l'activité des TGP (UI) au cours du traitement par la Vinblastine (1mg /kg), Epirubicine (1,60 mg/kg) seuls ou associés à la *propolis* (100mg/kg) en fonction du temps (jours).

III-2-1-2- Interprétation :

Au premier jour (J₀) d'administration de la Vinblastine 1mg/kg et de l'Epirubicine (1,60mg/kg), les activités des transaminases (TGP) du lot traité et du lot prétraité par les polyphénols (extrait de la *propolis* 100 mg /kg) sont équivalentes à celles de lot témoin (36,66 UI chez le traité, 39,99±37,7 UI chez le prétraité contre 42,829± 0,71 UI chez le témoin).

Après 7 jours (J₇), les transaminases (TGP) augmentent rapidement et d'une façon considérable chez le lot traité seulement par les médicaments par rapport au lot témoin (179,98 ± 4,73 UI chez le lot traité contre 45,360 UI chez le témoin).

En plus, l'activité des TGP chez le lot prétraité par les polyphénols (extrait de la *propolis* 100mg/kg) est considérable par rapport au lot témoins (93,32 ± 4,24 UI chez le lot prétraité contre 45,360 UI chez le témoin). On remarque également que cette activité est plus faible chez le lot prétraité par les polyphénols par rapport au lot traité par les anticancéreux seuls (93 ,32 ± 4,24 UI chez le lot prétraité contre 179 ,98 ± 4,73 UI chez le lot traité).

Après 14 jours (J₁₄) nous avons noté une légère variation dans le taux du TGP chez le lot traité par rapport à celle du (J₇), mais le lot prétraité exprime une diminution supplémentaire en comparant avec le 7^{ème} jour.

Après 21 jours (J₂₁) les valeurs de TGP chez le prétraité sont très proches à celles du groupe témoin (43,32UI chez le lot prétraité contre 46,66UI chez le témoin).

III-2-2- Le dosage cytosolique :

III-2-2-1- Évaluation malondialdéhyde (MDA) :

III-2-2-1-1- Résultats :

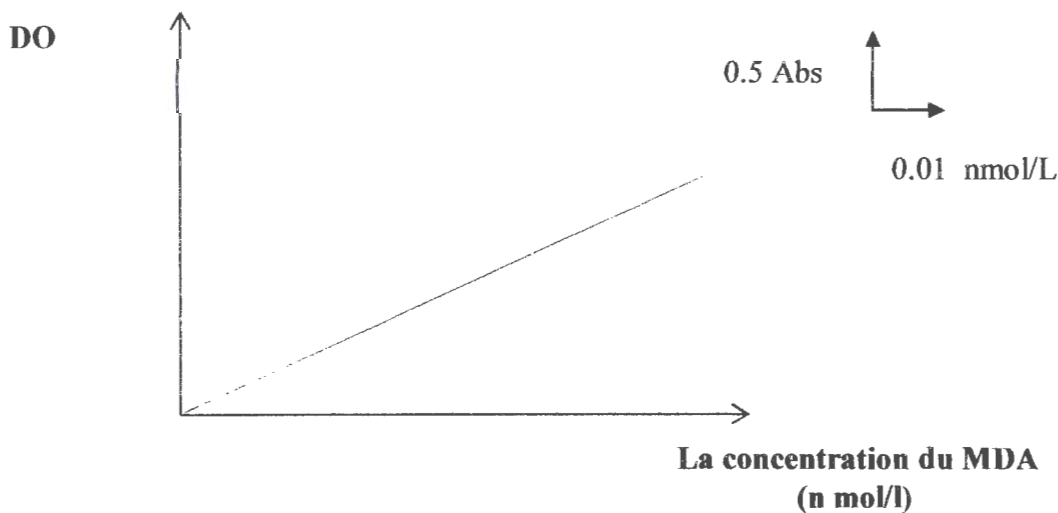
III-2-2-1-1-1- Résultats de la réalisation de la courbe d'étalonnage du MDA : (tableau 10)

Tableau 10 : La représentation des résultats de la courbe d'étalonnage de MDA.

La concentration du malonedialdéhyde (MDA) nmol / l	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.10
La densité optique (DO)	0.030	0.120	0.414	0.902	1.95

Le coefficient de corrélation $r = 0,99$

Les résultats de la courbe d'étalonnage sont représentés ci-dessous (la courbe 01) :



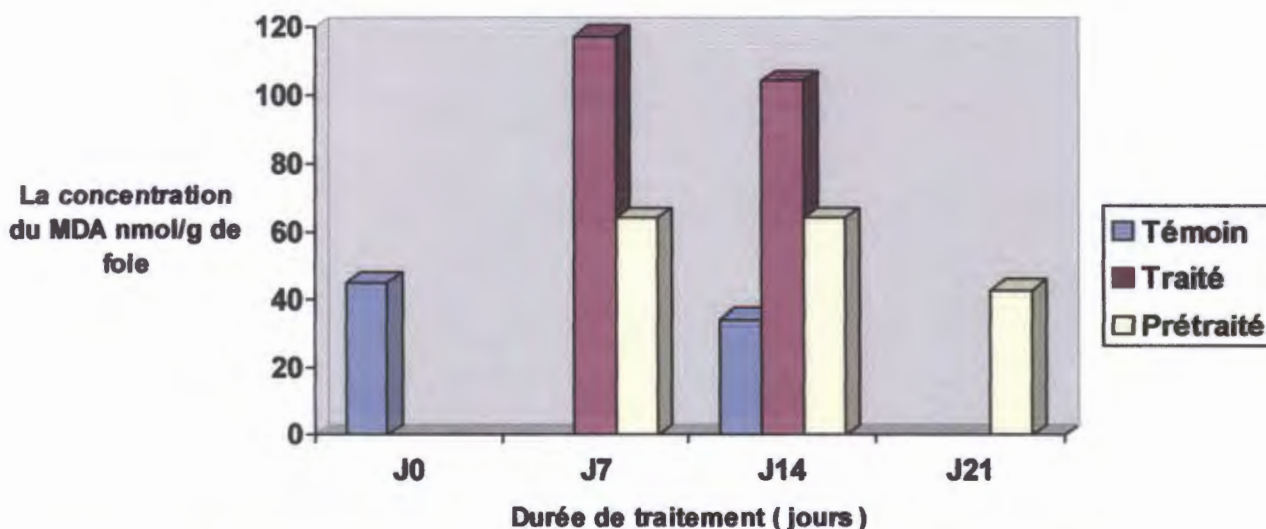
La courbe 01 : La courbe d'étalonnage du MDA

III-2-2-1-1-2- Résultats de dosage du MDA :

L'évaluation des taux du malondialdéhyde (MDA) du tissu hépatique après traitement par la Vinblastine (1 mg/kg) et l'Epirubicine (1,60 mg/kg) seuls ou associés aux polyphénols (L'extrait de la *propolis* 100mg/kg) sont représentés dans le (tableau 11) et l'histogramme 02.

Tableau 11 : variations des taux de malondialdéhyde (MDA) du tissu hépatique par nmol/ g de foie, suivant l'administration de la Vinblastine (1mg/kg) et l'Epirubicine (1,60 mg/kg) seuls ou associés à l'extrait de la *propolis* (100mg/kg).

Durée du traitement (jours) Traitement	J ₀	J ₇	J ₁₄	J ₂₁
Le lot témoin (n=2)	45.00	—	34.50	—
Le lot traité par : La Vinblastine (1mg/kg) L'Epirubicine (1,60 mg/kg) (n=4)	—	117.54±22,28	104.00	—
Le lot prétraité par : La Vinblastine (1mg/kg), L'Epirubicine (1,60 mg/kg) et L'extrait brut de la propolis (100mg/kg) , (n=3)	—	78.37	63.75	42.75



Histogramme 02 : variation de la concentration du MDA (nmol/g de foie) au cours du traitement par la Vinblastine (1mg/kg) Epirubicine (1,60 mg/kg) et extrait de *la propolis* (100 mg/kg) en fonction du temps (jours).

III-2-2-1-2- Interprétation :

Après l’intoxication unique par la Vinblastine (1mg/kg) et l’Epirubicine (1,60 mg/kg), on constate une augmentation précoce et intense de l’MDA (malondialdéhyde) chez les animaux intoxiqués par ces deux médicaments au cours des 7 premiers jours (117,54 ± 22,28 nmol/g de foie contre 45,00 nmol/g de foie chez le témoin) .

Cependant, on note chez les animaux traités préventivement par les polyphénols (extrait de *la propolis* 100 mg/kg), une augmentation de la concentration de l’MDA moins élevée à du lot traité (78,37 nmol / g du foie contre 117,54 ± 22,28 nmol / g de foie chez le rat traité) et elle se diminue au cours des 15 jours suivants et deviennent équivalentes à celle du témoin (à (J₁₄) : 63,75 nmol /g du foie, à (J₂₁) : 42,75 nmol / g du foie contre 34,50 nmol / g du foie chez le témoin).

III-2-2-2- Évaluation du GSH :

III-2-2-2-1- Résultats :

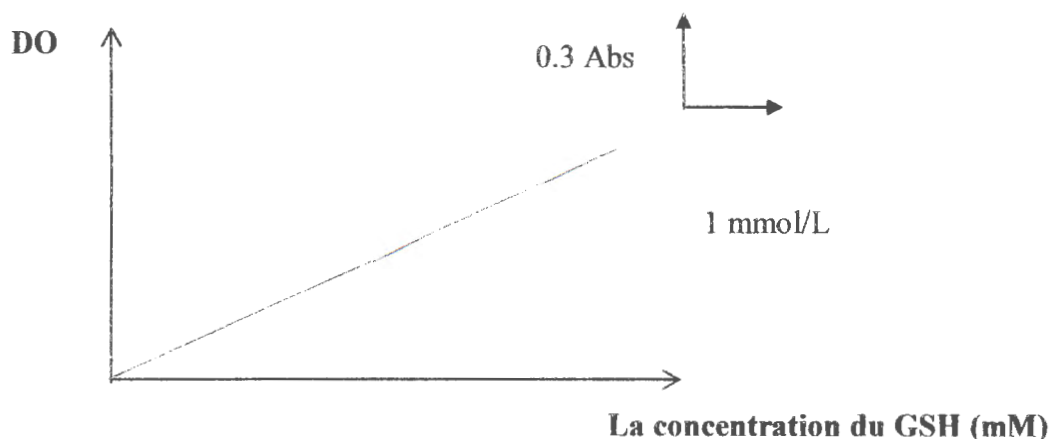
III-2-2-2-1-1- Résultats de la réalisation de la courbe d’étalonnage du GSH : (tableau 12)

Tableau 12 : La représentation des résultats de la courbe d’étalonnage de du GSH

La concentration du glutathion (GSH) (mmol / l)	0	1.25	2.5	5	10
La densité optique DO	0.012	0.014	0.023	0.066	0.150

Le coefficient de corrélation $r = 0.985$.

Les résultats de la courbe d'étalonnage sont représentés si dessous (La courbe 02) :



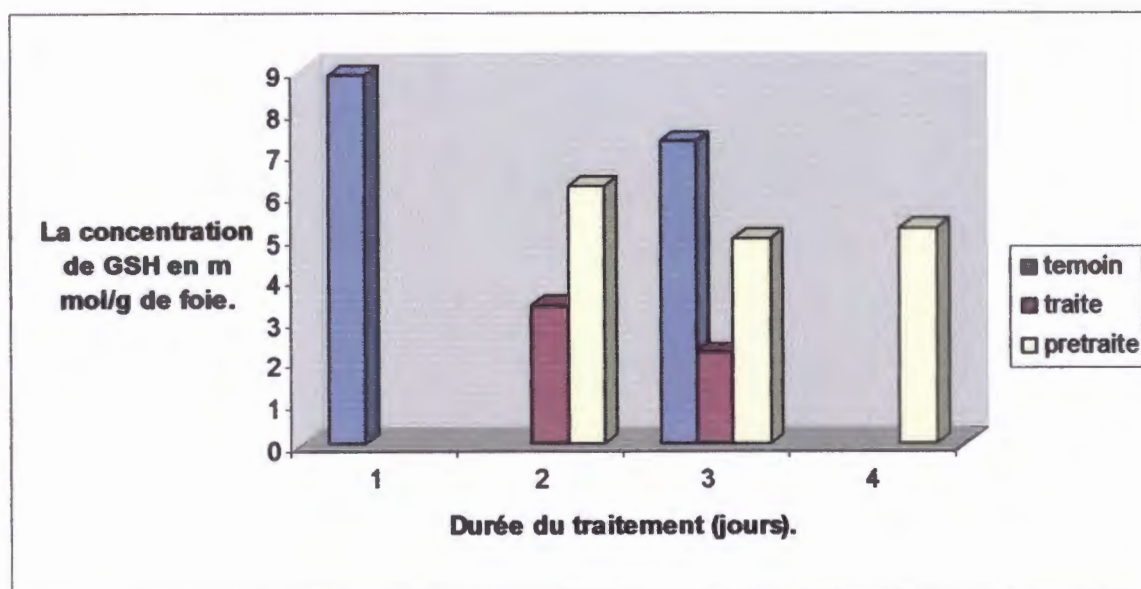
La courbe 02 : La courbe d'étalonnage du GSH.

III-2-2-2-1-2- Résultats de dosage du GSH :

Les variations des taux de glutathion intracellulaire de foie sont représentés dans le (tableau 13) et par l'histogramme 03 :

Tableau 13 : Variation des taux de glutathion (GSH) hépatique par m mol/g de foie après l'injection de la Vinblastine (1mg/kg) et l'Epirubicine (1,60) mg/kg seuls ou associés à la propolis 100 mg/kg en fonction du temps (jours) .

Durée du traitement (jours)	Traitement			
	J ₀	J ₇	J ₁₄	J ₂₁
Le lot témoin , (n=2)	8.87	—	7.28	—
Le lot traité par : La Vinblastine (1mg/kg) et L'Epirubicine (1,60 mg/kg) (n=4)	—	3.35 ± 0.98	2.21	—
Le lot prétraité par : La Vinblastine (1mg/kg), L'Epirubicine (1,60 mg/kg) et L'extrait brut de la propolis (100mg/kg), (n=3)	—	6.21	4.96	5.21



Histogramme 03 : Évaluation de la concentration du GSH (m mol/g de foie) après l'administration de la Vinblastine (1mg/kg) , Epirubicine (1,60 mg/kg) et l'extrait de la *propolis* en fonction du temps (jours).

III-2-2-2-2- Interprétation :

Après 7 jours (J_7) de l'injection de ces deux médicaments ; Vinblastine (1 mg / kg) et Epirubicine (1,60mg / kg) , on note une baisse sensible et considérable de la concentration du GSH hépatique entre le lot traité et le lot témoin ($3,35 \pm 0,98$ m mol / g du foie contre 8,87 mmol /g du foie chez le témoin) . La concentration du GSH continue à se diminuer durant les 7 jours suivant (à J_{14} 2,21 m mol /g de foie contre 7.28 m mol /g de foie chez le témoin) .

Cependant la concentration du glutathion hépatique chez le groupe des animaux prétraités par les polyphénols (extrait de la *propolis* 100 mg / kg) est élevée par rapport à celle du traité et se rapproche à celles de témoin (6,21 mmol /g de foie contre 3.35 ± 0.98 mmol /g de foie chez le lot traité et 8.87 mmol /g de foie chez le lot témoin) et la variation de sa valeur est presque stable au cours du traitement .



Chapitre IV
Discussion

IV - La discussion :

Les produits chimiques utilisés comme médicaments doivent avoir une efficacité thérapeutique et être sûrs ; malheureusement, ils peuvent tous produire des effets non recherchés (HAROMAN et al, 1998).

La Vinblastine (velbé) est l'un des médicaments anticancéreux , de la famille des alcaloïdes de la pervenche, très utilisé pour le traitement du cancer ,cependant l'utilisation de ce médicament reste restreinte par sa toxicité non limitée sur les tissus sains notamment , le sang , le tissu hépatique et rénal (BOULKOUR ,2004).

L'Epirubicine est un antibiotique antinéoplasique de la classe des anthracyclines, il a des effets indésirables divers (TRAMER, 2001).

La polychimiothérapie (dans notre étude l'association de la Vinblastine avec l'Epirubicine) permet d'augmenter la fréquence, l'importance et la durée des réponses et d'améliorer l'index thérapeutique par rapport à la monochimiothérapie (ESPIE et al, 1992).

Nous avons intéressé à l'étude de la toxicité hépatique provoquée par ces deux médicaments.

Le foie est l'organe le plus exposé aux effets toxiques des produits chimiques et des médicaments étant donné le lieu du métabolisme d'un grand nombre de ces derniers. Les médicaments comme d'autres substances nécessitent des biotransformations pour être excrétés (SIEST et al ,1989).

La toxicité cellulaire résulte de l'activité du cytochrome P₄₅₀, car la biotransformation des médicaments nécessite la présence d'oxygène moléculaire ; ce qui aboutit parfois à la formation de composés électrophiles toxiques et produit des radicaux libres.

En plus les métabolites produits peuvent être stables ou instables (dits métabolites réactifs) , donc peuvent se lier avec des constituants hépatiques et être potentiellement toxiques

(BUFFET ,1999) dont les lésions hépatiques sont proportionnelles à la quantité des métabolites réactifs et radicaux libres formés (NEZELOF ,1983).

Pour lutter contre cette hépatotoxicité et se protéger contre cet effet toxique l'organisme a développé des systèmes de défense :

- Les antioxydants enzymatiques : SOD, catalase.
- Les antioxydants non enzymatique (de petite taille): le glutathion , les polyphénols (flavonoïdes) vitamine C, vitamine E , les oligoéléments (CHAN et al ,1994).

Le nombre important des flavonoïdes dans la *propolis* (de la ruche), qui ont des multiples et intéressantes propriétés thérapeutiques, explique certains actions de la propolis (telle que la propriété antioxydante) (DONADIEU ,2001).

✦ Pour vérifier les effets hépatoprotecteurs des polyphénols sur une hépatotoxicité induite par les médicaments anticancéreux ; la Vinblastine (1 mg /kg) et l'Epirubicine (1.60mg / kg), administrés une seul fois chez des rats "Wistar", nous avons étudié les conséquences hépatiques du traitement par ces deux médicaments seuls et avec la prévention par les polyphénols (100 mg / kg). Les paramètres mesurés qui rendent compte à la fois de l'intoxication des lots traités par la Vinblastine et l'Epirubicine et de l'effet préventif de l'extrait de la *propolis* (lot prétraité) sont :

- Les transaminases glutamo-pyruvique (TGP) plasmatiques : les transaminases (TGP, TGO) sont des indices de nécrose (cytolyse), cependant le dosage de TGP est un test plus spécifique de la fonction hépatique que le dosage du TGO (CHAREL, 1991).
- Le malondialdéhyde (MDA) : bien que les espèces oxygénées réactives provoquent des altérations diverses aux constituants cellulaires, les produits issus de la peroxydation lipidique semble à priori les meilleurs marqueurs de stress oxydant (notamment le malondialdéhyde) (LEFEVRE, 2003).
- Le glutathion (GSH) : est un antioxydant qui joue un rôle à plusieurs niveau dans la lutte contre le stress oxydant, la fixation des radicaux libres et des métabolites réactifs consomme le glutathion ce qui conduit à une déplétion (FERRARI, 1991).

Après l'administration des anticancéreux (Vinblastine à dose de 1 mg/kg et l'Epirubicine 1,60 mg/kg) chez le lot traité nous avons constaté une augmentation considérable de TGP, de MDA et une diminution du GSH.

Pour le GSH chez le lot traité, nous avons noté une diminution du taux de GSH (glutathion) après l'administration des anticancéreux ; ($3,35 \pm 0,98$ mmol/g de foie) après 7 jours et ($2,21$ mmol/g de foie) après 14 jours, contre ($8,87$ mmol/g de foie) chez le témoin.

Ces résultats expliquent que les métabolites instables et les radicaux libres résultants de la biotransformation des médicaments (Vinblastine et Epirubicine) peuvent également se fixer sur le glutathion hépatique qui est un composé endogène et qui lutte contre le stress oxydant soit :

- En éliminant du H_2O_2 et des LOOH qui servent de substrats à l'enzyme GSH peroxydase (FERRARI et al, 1991).
- En inhibant la peroxydation lipidique.
- En piégeant directement certains radicaux libres (OH^\bullet , $O^{\bullet-}_2$) (FERRARI 1991). Cependant cette fixation consomme le glutathion hépatique dont les concentrations hépatiques finissent par s'effondrer, et lorsque les moyens de défense sont débordés, ces produits réactifs ne peuvent alors se fixer sur le glutathion et se fixent sur les constituants cellulaires (les lipides, l'ADN, les protéines, les sucres....) (HAGEGE et al, 1977).

Pour ce qui concerne le MDA : nous avons constaté chez le lot traité une augmentation du taux de MDA après le traitement (chez le lot traité) : ($117,54 \pm 22,28$ nmol/g de foie) après 7 jours et (104 nmol/g de foie) après 14 jours, par rapport au lot témoin (45 nmol/g de foie).

L'augmentation de MDA est due à la peroxydation lipidique résultante de l'altération des lipides des membranes péricellulaires et intracellulaires par les métabolites réactifs et les radicaux libres résultants du métabolisme de ces deux médicaments.

En revanche, les acides gras insaturés qui composent les phospholipides membranaires sont très vulnérables au niveau de leur double liaison, ce qui conduit à l'augmentation des concentrations du malondialdéhyde (substance cytotoxique). Cette désorganisation commence par un défaut de la fluidité, elle se poursuit par des perturbations de plus en plus marquées qui peuvent aller jusqu'à la lyse complète de la membrane (la cytolyse) (JADOT, 1994).

On constate une augmentation de l'activité du TGP chez le lot traité, après le traitement par ces deux anticancéreux puis une diminution de cette activité : (36,66 UI) le jour du traitement, (179,98 ± 4,73 UI) après 7 jours et (176,54 UI) après 14 jours.

L'augmentation de l'activité de TGP dans le sang peut être expliquée par l'installation d'une cytolysse hépatique (nécrose cellulaire), ce qui aboutit à la libération des constituants cellulaires dans le sang comme les transaminases, alors que la diminution est expliquée par la réparation des cellules et l'élimination du TGP plasmatique (dissociation).

L'administration de l'extrait de la *propolis* (les polyphénols) à nos rats, à titre préventif (100mg/kg) chez le lot prétraité, puis le traitement par la Vinblastine 1 mg/Kg et l'Epirubicine 1,60 mg/Kg, nous a permis de constater une faible augmentation de TGP et de MDA, et une faible diminution du taux de GSH par rapport au lot traité, cependant ces résultats sont rapprochés aux résultats du lot témoin.

Nous avons noté une faible diminution de taux de GSH chez le lot prétraité par l'extrait de la *propolis*, (6,21mmol/g de foie) après 7 jours, (4,96 mmol/g de foie) après 14 jours et (5,21mmol/g de foie) après 21 jours par rapport au lot témoin (8,87mmol/g de foie).

Ces résultats sont confirmés par d'autres travaux (BOULKOUR, 2004).

On peut expliquer ces résultats par :

- Les flavonoïdes existant en quantités élevées dans l'extrait de la *propolis* sont capables de piéger et de désactiver les radicaux libres (ROBAK et al, 1988).
- Les flavonoïdes peuvent agir par activation du turn-over du glutathion et des enzymes particulièrement les glutathions transférases, permettant la captation des métabolites réactifs des médicaments étudiés (LAHOUEL et al, 1985) ce qui explique la moindre consommation de glutathion, et la concentration de glutathion reste un peu forte par rapport au lot traité.
- Pour ce qui concerne le MDA, nous avons noté une faible augmentation de MDA par rapport au lot prétraité, (78,37nmol/g de foie) après 7 jours, (63,75nmol/g de foie) après 14 jours, (42,75 nmol/g de foie) après 21 jours, contre (34,50 nmol/g de foie) chez le témoin.

Ceci est confirmé par d'autres études (LAHOUEL et al, 2004).

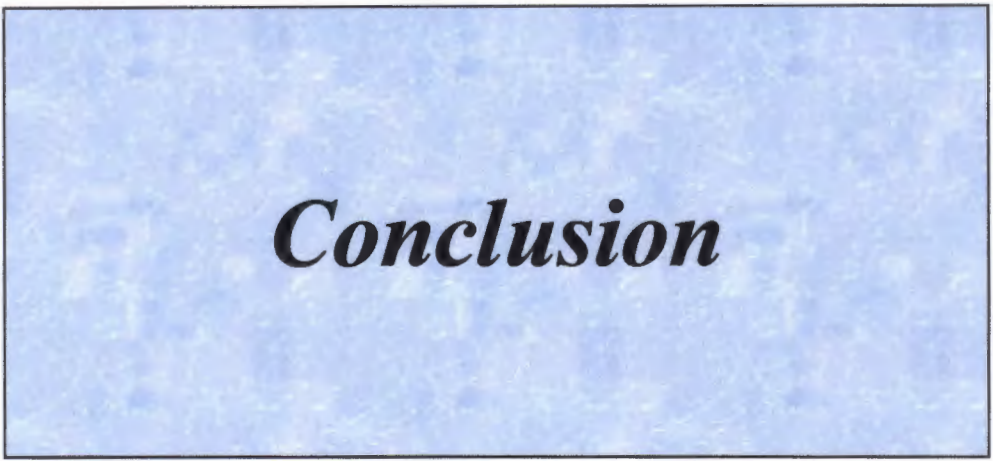


Ces résultats indiquent qu'il y a une moindre de la peroxydation lipidique, l'extrait de la *propolis* possède donc une activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (effet antioxydant) donc on obtient moins de perturbations membranaire et moins de cytolysse

Pour le TGP : nous avons une faible augmentation de l'activité de TGP, puis une diminution de cette activité, ($39,99 \pm 37,70$ UI) le jours de l'administration, ($93,32 \pm 4.24$ UI) après 7 jours, ($63,32$ UI) après 14 jours, ($43,32$ UI) après 21 jours Ceci est comparable aux plusieurs travaux (VIOTTE et al ,1986).

Le faible taux de cytolyse hépatique conduit à la diminution de la libération des constituants cellulaires dans le sang et donc une baisse de l'activité des transaminases (TGP).

Donc l'extrait de la propolis riche en flavonoïdes a la capacité de lutter contre le stress oxydant, en piégeant les radicaux libres, en activant le turn-over du glutathion et des enzymes (glutathions transférases) et en inhibant la peroxydation lipidique.





Conclusion

Conclusion :

Notre organisme est en permanence soumis à un stress oxydant susceptible d'endommager les cellules et les tissus, et d'induire diverses pathologies (GUTTERIDGE et al ; 1992).

Les médicaments ou les substances chimiothérapeutiques ciblent efficacement les cellules cancéreuses comme elles peuvent altérer les cellules intactes par leurs métabolites réactifs qui donnent naissance à un stress oxydant touchant notamment les hépatocytes.

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui font l'objet de nombreuses recherches, ceci est notamment le cas des polyphénols (BAHORUM, 1994)

L'étude de l'activité pharmacologique des polyphénols (extrait de la *propolis*) sur des rats de laboratoire aux quels nous avons administré les médicaments anticancéreux (Vinblastine 1mg/1g, Epirubicine 1,60mg/1kg) a permis :

- De vérifier l'hépatotoxicité de ces deux médicaments (Vinblastine 1mg/kg et Epirubicine 1,60mg/kg) par la modification apparente obtenue de certains paramètres tels que : les transaminases TGP, le malonedialdéhyde MDA et le glutathion GSH.
- De confirmer l'effet préventif de l'extrait polyphénolique qui s'avère positive dans ce cas pathologique, puisque son administration permet de réduire les taux élevés des (TGP, et MDA) et d'augmenter le taux de glutathion GSH.
- De confirmer l'effet scavenger des polyphénols sur les radicaux libres.

Le protocole expérimental suivi dans notre étude, nous permet de confirmer l'effet hépato-protecteur des polyphénols; malgré qu'elle est proche aux expériences précédentes, elle restera incomplète pour confirmer les résultats obtenus, surtout qu'elle a été réalisée sur un nombre de rats insuffisant pour l'étude statistique.

Pour terminer; une meilleure connaissance des structures des polyphénols, de leur biodisponibilité, leur mécanisme d'action au niveau moléculaire et leur demi-vie, permettra de bien étudier l'effet préventif de ces substances naturelles.



Bibliographie



BIBLIOGRAPHIE :

1. **ALLAIN P.**, Les médicaments. 3^{ème} Ed : Masson (Paris), 2001, p :500.
2. **ANDRIEU J.M.** Traitements actuels des cancers, Ed : Masson (Paris), 1987, p: 86-103.
3. **BAHORUM T., TROTIN F., POMMERY J., VASSEUR J. et PINKAS M.**, Anti-oxydant activities of *crataegus monogyma* extracts. J. planta med, 1994, 60 : 323-328.
4. **BENHAMOU J.**, Foie, pancréas et voies biliaires. 3^{ème}Ed : Flammarion (Paris), 1980, p : 9-131.
5. **BOULKOUR S.**, Étude du rôle des flavonoïdes dans la prévention de la toxicité hématologique, hépatique et rénale de la Vinblastine, l'Isoniazide et du Paracétamol. Thèse de Magister de toxicologie, Jijel (Algérie), 2004, p :II-20, II-40.
6. **BRUNETON J.**, Pharmacognosie (phytochimie plantes médicinales). 2^{ème} Ed : Medical international (Paris), 1993, p : 266-300.
7. **BRUNETON J.**, Pharmacognosie (phytochimie plantes médicinales). 3^{ème} Ed : Medical international (Paris), 1999, p : 227-229.
8. **BUFFET C.**, Guide pratique des maladies du foie, du pancréas et des voies biliaires. Ed: Mimi (Paris) , 1999 , p: 75-112 .
9. **BULEON A. et METAYER P.G.**, Projet de biologie structurale des polyphénols. Ed : INRA, 2004, p :55-98.
10. **CAPPELLEARE P.**, Le dictionnaire des cancers de A à Z. Ed : Masson (Paris), 2002,
11. **CHAN K. et DEKER E.**, Endogenous skeletal muscle antioxidants. Ed : Crit (Paris) 1994,p : 403-426.
12. **CHAREL M.**, Sémiologie biochimique. Ed : Ellipse (Paris), 1991, p : 60-76.
13. **COHEN Y.**, Pharmacologie. 4^{ème}Ed : Masson (Paris), 1997, p : 425 -441.
14. **COSTIL V.**, Hépto-gastro-entérologie. Ed: Masson (Paris), 1996, p: 325-340.
15. **CURTIN J.F. DONOVAN M. et COTTER T.G.**, Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. J: Immunol methods , 2002, 265, p: 49-72.

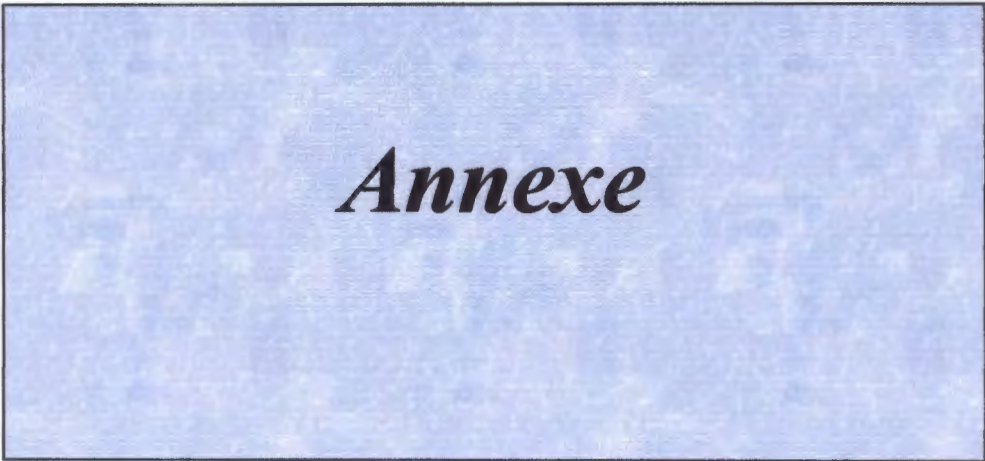
16. **DANEL V.**, Intoxication aiguë par le paracétamol. In : Carli P. Protocoles 200- Urgences, plans et schémas thérapeutiques. J : Scien L, 2004, p : 193-195.
17. **DARCY-VRILLON B.**, La nutrition, stéroïdes et os. Ed: INRA (Paris), 2003, p : 5-8.
18. **DARDIK R., VARON D., TARMINAL L.**, Homocysteine and oxized low density flow conditions: distinct mechanism of thrombagasier modulation. J: Throubo haemost, 2000, 83, p: 338-344.
19. **DIJON L.**, Chimiothérapie anticancéreuse des disoncologies. Ed: Maloine (Paris), 1997, p : 165.
20. **DONADIEU Y.**, *Propolis* l'intégrale dossier complet, Ed: Maloine (Paris), 1975, p:03-18.
21. **DONADIEU Y.**, Thérapeutiques naturelles, *propolis*, Ed : Vigot-Maloine (Paris), 2001, p : 01-28.
22. **DORE D.**, Biochimie clinique, Ed : Flammarion (Paris), 1986, p : 450-500.
23. **ERNSTR L. et DALINER G.**, Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. J: BBA, 1988, 1271, p: 195-204.
24. **ESPIE M., EXTRA J. et MARTY M.**, Pharmacologie. Ed : Frisson-roche (Paris), 1992, 2, p: 793-920.
25. **FAVIER A.**, Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, actualité chimique.J : Ann Biol Clin, 2003, 55, p : 09-16.
26. **FERRARI R.**, 4-Hydroxynonénal : un produit de la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres, 1991, p : 45-68.
27. **FOA J., BARTOLIN R., DELBOY C.**, Manuel de thérapeutique médical. Ed : Masson (Paris), 1985, p: 344.
28. **FOUET P.**, Hépatologie, Ed : Masson (Paris), 1978, P : 69-70.
29. **GELLA F. G., OLIVELLA T., CRUTZ P.M., ARENAS J., MORENO R.** A simple procedure for routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. J: Clin Chim Acta, 1985, 153, p: 241-247.
30. **GEY K.F., MOSER U.K., JORDAN P., STAHELIN H.B., FICHOŁZER M. et LUDIN E.**, Increased risk of cardiovascular disease and suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants. J: Am J Clin Nuter, 1993, 57, p : 787-797 .

31. **GHISELLI A., SERAFINI M., NATELLA F., SCACCINI C.**, Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *J: Free Radi Biol Med*, 2000,29, p: 1106-1114.
32. **GONZALEZ A.et NEBERT**, Le métabolisme enzymatique des médicaments, Ed : Masson (Paris),1990.p :124-145.
33. **GUTTERIDGE J.M.C.**, Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *J: Free Rad Res*, 1993, 19, p: 141 -158.
34. **GUTTERIDGE J.M.C., ROWLEY D.A. et HALLIWELL B.**, Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. *J: Biochem*, 2006, 206, p: 315-345.
35. **HAGEGE H. et BUFFET C.**, Pathologie médicale à l'usage des infirmiers, 9^{ème} Ed : Doin (Paris), 1977, p : 520-534.
36. **HAROMAN G.J.** : Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments. 9^{ème} Ed : MG GRAW HILL (Canada), 1998, p : 63-74.
37. **HAVESTEEN B.**, Flavonoids a class of naturel product of hight pharmacological potenney biochemical pharmacology, 1983, 8, p: 1141.
38. **HAYASHI O.**, My life, oxygen retrospective, perspective oxygénases, and oxygen metabolism, Ed: Nozk (Berlin), 1982, P: 1-13.
39. **HENDERSON A. R. et MOSS D.W.**, Enzymes. Tietz fundamentals of clinical chemistry. 5^{ème} Ed: Burtis (Philadelfia), 2000.
40. **HERTOG M.G.**, Antioxydant flavonols. Ed : Maloine (Paris), 1997, p : 122-154.
41. **HILDEN R.J., SHAFFER E.A.**, Principes fondamentaux de gastro-entérologie : États pathologiques et démarches thérapeutiques. Eds : AstraZeneca (Canada), 2000, 14, p: 520-525.
42. **HOLLMAN P.C.H., DEVRISES J.H.M. VALEEVEN S.D. MENGELERS M.J.B. et KATAN M.B.**, Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers? *Amer. J: Clin Nutr*, , 1995, 62, p: 1276-1282.
43. **JADOT G.**, Antioxydants et vieillissement, Ed : Jea_hn Librery Eurotext, 1994, p : 34-60.
44. **JANERO D.**, Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidation tissue myury free radical. *J: Biol med*, 1990, 2, p: 515-540.

Bibliographie

45. **KREGEL K.**, Heat shock proteins; modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J: Appel Physiol*, 2002, p: 2177-2186.
46. **KRINSKY N.I.**, Mechanism of action of biological antioxidants. *J: Exp Biol Med*, 1992, 200, p: 248-254.
47. **LAHOUEL M.**, Étude de la toxicité hématologique, hépatique et rénale de deux médicaments anticancéreux : la Doxorubicine et la CCNU chez le rat, Thèse de doctorat, Rouen France, 1985, p : 32-35.
48. **LAHOUEL M., BOULKOUR S., SEGUNI N., FILLASTRE J.P.**, Effet protecteur des flavonoides contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *J : Path Biol*, 2004.
49. **LAIRON D.**, Biodisponibilité et effets biologiques des anti-oxydants de nature polyphénolique. Ed : Flammarion (Paris), 2000, p : 57-76.
50. **LANGLIS-WILIS I. et LEPRESTE E.**, Le corps humain, 2^{ème} Ed : DeBoeck UNIVERCITY (Florida),1996, p : 496.
51. **LECHAT P., LAGIER G., ROUVVEIX B., VINCENS M. et WEBER S.**, Pharmacologie médicale. Ed : Masson (Paris), 1992, p : 89.
52. **LECHAT P.**, Pharmacologie DCEM1. Ed: CHU-PS (Paris), 2006, p: 353-363.
53. **LEFEVRE G., BELJEAN-LEYMARIE M., BEYOLE S., ROUSSELOT D., CRISTOL J.P.R. THEROND P., THORREILLES J.**, Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *J : Ann Biol Clin*, 2003, 56, p : 305.
54. **LEMAIRE V., FRYDMA R., GENTILINI M. et GUERIN F.**, La rousse médicale. Ed : Larousse, 2000, p: 325.
55. **LEVINE S.A., et KIDED P.**, Antioxidant adaptation, its role in free radical pathology, Ed: Bioccurrent allergy research group, 1996.
56. **LOGANI M.K. et DAVIES R.E.**, Lipid oxydation , biologic affects and antioxydants. 1980, 15, p: 485-495.
57. **MANACH C., TEXIER O. REGERAT F., AGULLO G., DEMIGNE C et REMESY C.**, Dietary quercetin is recovered in rat plasma as conjugated derivatives of iosrhamnetin and qurcetin. *Nuter Biochem*, 1996, 7, p: 375-380.
58. **MAROUF A. B.R.**, Dictionnaire de botanique, les phanérogames. Ed : Donod (Paris),

74. **ROREL J., CARON J., CHANARD J., GOUGEON J., LEUTNEGGER M., MAQUART F.X., POTRON G., RANDOUX A. et ZEHOUN P.** Comment prescrire et interpréter un examen biochimique. 2^{ème} Ed : Maloine(Paris), 1997. P : 696.
75. **ROULIER G.**, La méthode naturelle anti-age, Ed : Dangles (London), 2003, p : 21-25.
76. **RYTER S. et TYRREL R.**, the hème synthesis and degradation pathways role in oxidant sensitivity, hème oxygenase has both pro and antioxidant properties. J: Free Rad Bio Med, 2000, p: 289-300.
77. **SCALBERT A. et WILLIAMSON G.**, Dierty intake and bioavaibility of polyphenols. J: Nutr, 2000, 130, p: 273-285.
78. **SIEST G., MAGDALOU J., STRATIELLE N.** Aspects moléculaires du métabolisme hépatique des médicaments in : pharmacologie moléculaire, Ed : MEDSI MC graw hille (Florida), 1989, p : 185-270.
79. **SOHENY A., BAYLIN A., SPIELAMN D., ASCHIRON A., COMPOS H.** Dirctru and adipose tissue gamma-tocopherol and risk of myocardial infraction epidemiology. 2002, 13, p: 216-231.
80. **TALBERT M., WILLOQUE G.**, Guide pharmaco. Ed : Lammarre (Paris), 1998, p : 138.
81. **TIETZ N.W., SHERWIN J. E.** Text book of clinical chemistry. Ed: Saunders, 1986.
82. **TRAMER M.**, Cannabinoïdes for control of chemotherapy indeed nausea and vomiting: quantitative systematic review. Ed:Masson(Paris), 1992, p: 323-421.
83. **VASEY C.** Manuel de détoxication. Ed : Jouvence (Paris),1997.
84. **VAUBOURDOLLE M.** Biochimie : Feuillet de biologie X, Ed : Lammarre (Paris). 1998. P : 49 -145.
85. **VIDAL**, Le dictionnaire VIDAL 2002. 78^{ème} Ed : PABM, 2002, p : 683.
86. **VIOTTE G., LAHOUEL M., DUCASTELLE T.H., SUMEREAU E., MOR J.P., HAMET J. et FILLASTRE J.**, Hépatotoxicités du (chloro-2- éthyl -1-cyclohexyl-3-Nitroso-1-urée ou CCNU chez le rat. J: Path Biol d'urologie, 35, 1986,
89. **WALL J.** Antioxydants in prevention of reperfusion damage of vascular Endothelium. J : Pharmacologie, 2000, 1, p: 66-71.
90. **YAKER A.**, Cancérologie général. Ed : Office des publications universitaire (Algérie), 1985, p : 20-65.



Annexe

Annexe :

- La dose de l'Epirubicine en mg/kg :

$$70 \text{ kg} \rightarrow 1,87 \text{ m}^2$$

$$Y_6 \text{ Kg} \rightarrow 1 \text{ m}^2$$

$$Y_6 = 37,43 \text{ Kg}$$

$$60 \text{ mg} \rightarrow 37,43 \text{ Kg}$$

$$Y_7 \text{ mg} \rightarrow 1 \text{ Kg}$$

$$Y_7 = 1,60 \text{ mg}$$

$$60 \text{ mg/m}^2 = 1,60 \text{ mg/Kg}$$

- Préparation du TCA 5% :

$$\begin{array}{l} 5 \text{ g de TCA} \longrightarrow 100 \text{ ml (H}_2\text{O)} \\ X_1 \text{ g de TCA} \longrightarrow 50 \text{ ml (H}_2\text{O)}. \end{array}$$

$$X_1 = 2,5 \text{ g.}$$

Pour préparer 50 ml de TCA 5% ; il faut 2,5 g de TCA.

- Préparation du phosphate dissodique (Na_2HPO_4) 0,1M :

$$\begin{array}{l} 1\text{M de Na}_2\text{HPO}_4 \longrightarrow 142 \text{ g.} \\ 0,1\text{M de Na}_2\text{HPO}_4 \longrightarrow X_2. \end{array}$$

$$X_2 = 14,2 \text{ g.}$$

$$\begin{array}{l} 14,2\text{g} \longrightarrow 1000 \text{ ml.} \\ X_3 \text{ g} \longrightarrow 200\text{ml.} \end{array}$$

$$X_3 = 2,84 \text{ g}$$

Pour préparer 200ml de tampon phosphate 0,1M; il faut 2,84 g de Na_2HPO_4 .

- Préparation du DTNB : 0,01M :

$$\begin{array}{l} 1\text{M de DTNB} \longrightarrow 396,35 \text{ g.} \\ 0,01\text{M de DTNB} \longrightarrow X_4 \text{ g.} \end{array}$$

$$X_4 = 3,9635 \text{ g.}$$

$$3,96 \text{ g de DTNB} \longrightarrow 1000 \text{ ml (H}_2\text{O)}.$$

X_5 g de DTNB \longrightarrow 10 ml (H_2O).

$$X_5 = 0,039 \text{ g.}$$

Pour préparer 10 ml de DTNB 0,01M; il faut 0,039g de DTNB.

- Préparation du GSH 10 mM :

3,15 mg du GSH \longrightarrow 10ml (H_2O).

X_6 mg du GSH \longrightarrow 2 ml (H_2O).

$$X_6 = 0,63 \text{ mg.}$$

Pour préparer 2ml du GSH 10mM il faut 0,63 mg.

- Préparation du KCl (1,15 M) :

1M du KCl \longrightarrow 74,45 g (KCl).

1,15 M (KCl) \longrightarrow Y_1 g.

$$Y_1 = 85,61 \text{ g.}$$

85,61 g (KCl) \longrightarrow 1000 ml (H_2O).

Y_2 g (KCl) \longrightarrow 30 ml (H_2O).

$$Y_2 = 2,568 \text{ g.}$$

Pour préparer 30 ml de KCl (1,15M) il faut 2,568 g de KCl.

- Préparation du TCA 20% :

20g de TCA \longrightarrow 100 ml (H_2O).

Y_3 g de TCA \longrightarrow 20 ml (H_2O).

$$Y_3 = 4 \text{ g.}$$

Pour préparer 20 ml de TCA 20% ; il faut 4 g de TCA.

- Préparation du TBA 0,67% :

0,67 g du TBA \longrightarrow 100 ml (H_2O).

Y_4 g du TBA \longrightarrow 10 ml (H_2O).

$$Y_4 = 0,067 \text{ g.}$$

Pour préparer 10 ml de TBA 0,67%; il faut 0,067 g.

- Préparation de la gamme d'étalonnage de l'MDA :

•Le flacon contient du tetrametoxyp propane 99% (TMP).

1M (TMP) \longrightarrow 164,20 g.
 Y₅ M (TMP) \longrightarrow 990 g.

Y₅ = 6,02 M (molarité).

• 6,012 mol (TMP) \longrightarrow 1000ml.
 Y₆ (mol) \longrightarrow 0,01 ml (10µl).

Y₆ = 6 × 10⁻⁵ mol (dans 10 µl du TMP 99% ; il y a 6 × 10⁻⁵ mol).

•Pour obtenir le TMP 0,06 nmol, on ajoute a 10 µl de TMP 99%, 100 ml (H₂O), puis on fait les autres dilutions.

- Résultats du test de Student :

$$t = \frac{|m_1 - m_2|}{\delta \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}, \quad \delta = \sqrt{\frac{s_1^2 n_1 + s_2^2 n_2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

n = nombre de rats.

S = écart type.

n₁ + n₂ - 2 = ddl (degré de liberté).

m = la moyenne.

	Le paramètre :
Entre :	TGP
Lot témoin et lot traité.	6,999* * *
Lot témoin et lot traité.	3,02*
Lot traité et lot prétraité.	3,95*

Test de Student :
 P > 0,05 (*) , 0,05 > P > 0.01 (* *) , 0,01 > P > 0,001 (* * *) , ns = non significatif

Résumé

La Vinblastine et l'Epirubicine sont des médicaments vastement utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Nous avons étudié la toxicité de ces médicaments administrés seuls ou associés aux polyphénols (chez les rats wistar) et suivi l'évolution de la fonction hépatique durant une période de 21 jours.

Les résultats que nous avons obtenus ont montré que la Vinblastine à la dose de 1mg/kg et l'Epirubicine à la dose de 1,60 mg/kg sont responsables de l'apparition d'une toxicité hépatique.

Par contre, leur association aux polyphénols (extrait de la *propolis* à la dose de 100mg/kg) diminue leurs effets toxiques sur le foie.

Ceci prouve l'effet préventif des polyphénols contre cette toxicité hépatique.

Mots clés

Propolis, polyphénols, rats, chimiothérapie, hépatotoxique, Vinblastine, Epirubicine.

المخلص

الفينبلاستين والإيبريبيسين عبارة عن أدوية واسعة الاستعمال في المعالجة الكيميائية لمرضى السرطان. لقد قمنا بدراسة سمية هذه الأدوية المحقونة لوحدها أو مرفقة بمتعدد الفينول على جرذان المخبر الأبيض و تتبعنا التطورات على مستوى الكبد مدة 21 يوما. النتائج التي تحصلنا عليها بينت أن الفينبلاستين بجرعة 1مغ/كغ والإيبريبيسين بجرعة 1,60 مغ/كغ مسؤولان على ظهور تسمم كبدى. غير أن إضافة هذه الأدوية إلى متعدد الفينول (مستخلص بروبوليس) بجرعة 100مغ/كغ تنقص من سميتها للتسبب الكبدى. مما يؤكد المفعول الوقائى لمتعدد الفينول ضد هذا التسمم الكبدى.

مصطلحات

بروبوليس، متعدد الفينول، جرذان، المعالجة الكيميائية، تسمم كبدى، الفينبلاستين، الأيبريبيسين.

Abstract

The Vinblastin and Epirubicin are drugs widely used in anticancer chemotherapy. We have studied the toxicity of this drugs witch are administered alone or associated with polyphenols (in the Wistar rats) and we have monitor the evolution of the hepatic function during a period of 21 days.

The results that we have obtained show that: the Vinblastin at 1mg/kg and the Epirubicin at 1,60mg/kg are responsible for the apparition of hepatic toxicity.

On the contrary, their association to polyphenols (extract of the *propolis* at 100mg/kg) decreases their toxic effects in the hepatic toxicity.

Key words

Propolis, polyphenols, rats, chemotherapy, hepatotoxicity, Vinblastin, Epirubicin.