

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel

Faculté des Sciences

Département de Biochimie et de Microbiologie

Mémoire  
de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme des  
Etudes Supérieures en Biologie Moléculaire et Cellulaire.

Option : Biochimie

BC.04/06

Thème

Etude de l'effet antioxydant des  
polyphénols extraits de la plante  
*Ranunculus repens* L dans le cas  
d'une hépatotoxicité induite par  
l'Epirubicine chez les rats.

Les membres de jury :

- Président : LAÏB Essaid
- Examinateur : ALIANE Mohammed
- Encadreur : KEBIECHE Mohammed



Réalisé par

- ✶ KROUN Siham
- ✶ LAKEHAL Houda
- ✶ BOULEGHLEGH Souaad

Promotion 2006

# Remerciement

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

*Nous tenons à formuler notre gratitude et notre profonde reconnaissance à l'égard de notre promoteur Monsieur KEBIECHE Mohammed pour sa compréhension, ses conseils judicieux, sa disponibilité et l'aide précieuse.*

*Nous voudrions remercier aussi les membres de jurys pour nous avoir honoré en acceptant de juger notre travail.*

*Notre remerciement s'adresse également aux :*

✎ *M<sup>lle</sup> KEBSA Widad*

✎ *ROUIBEH Hassiba*

✎ *Monsieur BOUSSOUF Nabil*

✎ *Le personnel du laboratoire de biologie de l'université de Jijel et surtout Houria et Ziad.*

✎ *Les enseignants de la faculté des sciences, qui nous ont transmis leur savoir durant les 4 ans.*

*En fin, nous remercions toute personne qui a participé de loin ou de près dans la réalisation de ce mémoire.*



# SOMMAIRE

Introduction .....	1
--------------------	---

## Etude bibliographique

### Chapitre I/La plante RRL et polyphénols

I-La plante <i>Ranunculus repens</i> L et polyphénols.....	2
I-1-La plante <i>Ranunculus repens</i> L.....	2
I-1-1-Introduction.....	2
I-1-2-Définition de la plante <i>Ranunculus repens</i> L .....	2
I-1-3-Systématique.....	2
I-1-4-Biologie du <i>Ranunculus repens</i> L.....	3
I-2-Les polyphénols .....	3
I-2-1- Définition.....	3
I-2-2-Classification des polyphénols .....	3
I-2-2-1-Les flavonoïdes.....	3
• Structure chimique .....	4
• Classification.....	4
• Rôle pharmacologique .....	4
I-2-2-2-Les tanins.....	4
• Classification.....	4
- Les tanins condensés.....	5
- Les tanins hydrolysables.....	5
• Rôle des tanins .....	5
- Tanins proanthocyanidines .....	5
- Tanins gallique et catéchique.....	5

### Chapitre II/La mitochondrie et le stress oxydant

II-La mitochondrie et le stress oxydant.....	6
II-1-La mitochondrie.....	6
II-1-1-Définition.....	6
II-1-2-Rôle physiologique de la mitochondrie.....	7
• La respiration cellulaire .....	7
- Transport des électrons par la chaîne respiratoire .....	7
□ Le complexe I.....	7

□ Le complexe II .....	7
□ Le complexe III .....	7
□ Le complexe IV .....	7
□ Le complexe V .....	8
• Phosphorylation de l'ADN par l'ATP synthétase .....	8
▪ Rendement énergétique de la respiration cellulaire .....	8
II-1-3-La mitochondrie et les radicaux libres .....	11
II-2-Le stress oxydant .....	11
II-2-1-Définition de stress oxydant .....	11
II-2-2-Les radicaux libres.....	11
• Définition .....	11
• Types des radicaux libres .....	12
• Rôle des radicaux libres .....	12
-Oxydation des protéines .....	12
-Oxydation des glucides.....	13
-Oxydation des acides nucléiques .....	13
-Oxydation des lipides .....	13
-Mécanisme de la peroxydation lipidique.....	14
-Le malonedialdéhyde.....	15
II-2-3- Les antioxydants.....	15
• Définition .....	15
• Types d'antioxydants .....	15
□ Les antioxydants enzymatiques .....	15
Superoxydes dismutase (SOD) .....	15
La glutathion peroxydase .....	16
Catalase .....	16
Les thiorédoxines (TRX) et la thiorédoxine réductase (TRXR) .....	16
L'hème oxygénase (HO).....	16
□ Les antioxydants non enzymatique .....	16
Vitamine E .....	16
Vitamine C .....	17
Les caroténoïdes.....	17
□ Oligo-éléments .....	17
Sélénium.....	17
Le zinc.....	17

Le cuivre .....	17
<b>Chapitre III / L'hépatotoxicité</b>	
III-1- L'hépatotoxicité.....	18
• Définition .....	18
III-2- Sémiologie hépatique dans le cas de l'hépatotoxicité .....	18
III-2-1- Les transaminases .....	18
• Aspartate aminotransférase (AST).....	18
• Alanine aminotransférase (ALT) .....	18
III-2-2- La bilirubine .....	18
III-2-3- Les phosphatases alcalines.....	18
III-3- L'induction de l'hépatotoxicité .....	19
• L'Epirubicine .....	19
-Mode d'action de l'Epirubicine .....	19
• Le tétrachlorure de carbone (CCl <sub>4</sub> ).....	19
-Mode d'action et effets sur la santé .....	19

## **Partie pratique**

### **Chapitre IV / Matériels et méthodes**

IV –Matériels et méthodes .....	21
IV-1- Matériels.....	21
IV-1-1- Les animaux.....	21
IV-1-2- La plante .....	21
IV-2- Méthode.....	21
IV-2-1- Extraction des polyphénols.....	21
• Le séchage.....	21
• Le broyage .....	21
• La macération .....	21
• La filtration .....	21
• Le dégraissage.....	21
• L'affrontement par le n-butanol.....	22
• L'évaporation à sec .....	22
• La quantification de la poudre .....	22
IV-2-2- Préparation des solutions administrée.....	24
IV-2-2-1- Solution polyphénolique.....	24
• Préparation de la solution mère.....	24

• Calcul de la masse administrée .....	24
• Calcul de volume correspondant.....	24
IV-2-2-2- Le médicament « Epirubicine ».....	24
• La face corporelle du rat .....	24
• Dose pour un rat du 0,005 m <sup>2</sup> .....	24
• Préparation de la solution mère.....	25
• Calcul de volume administrée.....	25
IV-2-3- Voies d'administration deS différents solutions.....	25
IV-2-3-1- Par gavage gastrique.....	25
IV-2-3-2- Par voie IP .....	25
IV-2-4- Traitement des animaux.....	26
IV-2-5- Prélèvement des échantillons.....	26
IV-2-5-1- Prélèvement du sang.....	26
IV-2-5-2- Prélèvement du foie.....	27
• Sacrifice des animaux .....	27
• Dissection.....	27
• Prélèvement du foie .....	27
• Préparation du cytosol.....	28
IV-2-6- L'étude de l'hépatotoxicité .....	28
IV-2-6-1- Dosage des transaminases .....	28
• Dosage du TGO .....	28
-Principe .....	28
-Réactifs utilisés .....	28
-Protocole d'évaluation du TGO.....	29
-Dosage du TGP .....	29
-Principe .....	29
-Réactifs utilisées .....	30
-Protocole d'évaluation du TGP .....	30
• Dosage du MDA « évaluation du stress oxydatif » .....	31
-Principe .....	31
-Réactifs utilisés .....	31
-Protocole d'évaluation du MDA.....	31
• Dosage de la catalase .....	32
• Dosage du glutathion hépatique.....	33

• Mesure de l'effet scavenger ou piègeur des ROS (méthode au OPPH°).....	33
IV-3- Analyse statistique .....	34
<b>Chapitre V / Résultats et interprétation</b>	
V-Résultats et interprétation .....	35
V-1- Evaluation des transaminases .....	35
V-1-1- Résultats des dosages du TGO .....	35
• Courbe d'étalonnage .....	35
• Etablissement de la courbe d'étalonnage .....	35
V-1-2- Résultats des dosages du TGP.....	37
• Courbe d'étalonnage .....	37
• Etablissement de la courbe.....	37
V-1-3- Evaluation du MDA .....	39
• Courbe d'étalonnage du MDA.....	39
V-1-4- Résultats de dosage du catalase.....	40
V-1-5- Résultats de dosage du glutathion hépatique .....	42
• Courbe d'étalonnage .....	42
• Etablissement de la courbe.....	42
V-1-6- Résultat de dosage du DPPH° .....	43
Calcul de pourcentage du réduction de DPPH° .....	43
<b>Chapitre VI/ Discussion</b>	
VI -Discussion .....	44
<b>Chapitre VII/ Conclusion</b>	
VII- Conclusion .....	48
<b>Références</b>	
<b>Résumé</b>	

## Liste des abréviations

- R.R.L : *Ranunculus repens* L .
- CCl<sub>4</sub> : Tétrachlorure de carbone.
- CCl<sub>3</sub> : Trichlorure de carbone.
- SOD : Superoxyde dismutase .
- MDA : Malonodialdehyde.
- GPX : Glutathion peroxydase.
- KDa : Kilo Dalton .
- ROS : Espèces réactives d'oxygène.
- MPT : Mitochondrial permeability transition pore.
- EAO : Espèces oxygénées activées .
- AST : Aspartate aminotransférase.
- ALT : Alanine aminotransférase .
- TGP : Glutamate pyruvate transaminase.
- TGO : Glutamate oxaloacétate transaminase.
- mg/m<sup>2</sup> : milligramme par mètre carré .
- ml/Kg : millilitre par kilogramme.
- IP : Intrapéritonéale .
- mg/Kg : Milligramme par kilogramme.
- mg/ml : Milligramme par millilitre .
- g/Kg : Gramme par kilogramme.
- n mol : Nanomol .
- Kcl : Chlorure de potassium.
- TCA : Trichloracétique.
- TBA : Acide thiobarbiturique .
- DTNB : 5,5' dithiobis ( 2-nitrobenzoic acid).
- TNB : Acide thionitrobenzoïque.
- DPPH<sup>o</sup> : 2,2-Diphényl-1- picrylhydrazyl.
- µl : Micro-litre .
- nm : Nano-litre.



## Liste des tableaux

-Tab. 01 : Répartition et traitement des rats .....	26
-Tab. 02 : Composition des différents réactifs utilisés pour la détermination du TGO .....	29
-Tab. 03 : Etapes de la réalisation du dosage du TGO .....	29
-Tab. 04 : Composition des différents réactifs utilisés pour la détermination du TGP .....	30
-Tab. 05 : Etapes de la réalisation du dosage du TGP.....	30
-Tab. 06 : Etapes de la réalisation du dosage du MDA.....	32
-Tab. 07 : Etape de la réalisation de la courbe d'étalonnage pour le TGO .....	35
-Tab. 08 : Evaluation du taux du TGO dans le cas des différents traitements .....	36
-Tab. 09 : Etapes de la réalisation de la courbe d'étalonnage pour le TGP .....	37
-Tab. 10 : Evaluation du taux du TGP dans le cas des différents traitements.....	38
-Tab. 11 : Evaluation du taux du MDA dans le cas des différents traitements .....	39
-Tab.12 : Etapes d'évaluation du taux de catalase .....	40
-Tab. 13 : Evaluation du taux de catalase dans le cas des différents traitements .....	41
-Tab.14 : Evaluation du taux de glutathion dans le cas des différents traitements .....	42
-Tab.15 : Mesures des D.O de DPPH <sup>o</sup> en fonction de temps(de30s-300s) <i>in vitro</i> , en présence de l'extrait butanolique de RRL .....	43

## Listes des figures

-Fig.01: La plante <i>Ranunculus repens L.</i> .....	2
-Fig.02: Squelette de base des flavonoïdes. ....	4
-Fig.03: Structures de pronthocyanidines. ....	5
-Fig.04: Description de la structure mitochondriale .....	6
-Fig.05: La chaîne respiratoire .....	9
-Fig.06: Complexe I .....	10
-Fig .07: Complexe II.....	10
-Fig .08:Complexe III .....	10
-Fig .09:Complexe IV .....	10
-Fig.10: Complexe V.....	10
-Fig.11: Peroxydation lipidique :la voie de synthèse du malonedialdehyde à partir des acides gras.....	14
-Fig.12: Protocole d'extraction des polyphénols .....	23
-Fig.13: Voie d'administration par gavage gastrique.....	25
-Fig.14:Voie d'administration en IP .....	26
-Fig.15: Méthode de prélèvement du sang.....	27
-Fig.16:Dissection du rat.....	27
-Fig.17: Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique .....	31
-Fig.18: Courbe d'étalonnage du TGO .....	35
-Fig.19: Evaluation du taux du TGO chez les différents lots.....	36
-Fig.20: Courbe détalonnage du TGP .....	37
-Fig.21: Evaluation du taux du TGPchez les différents lots .....	38
-Fig.22: Courbe d'étalonnage du MDA .....	39
-Fig.23: Evaluation du taux du MDACHEZ les différents lots .....	40
-Fig.24: Evaluation du taux du catalase chez les différents lots .....	41
-Fig.25: Courbe d'étalonnage du glutathion hépatique.....	42
-Fig.26: Evaluation du taux du glutathion chez les différents lots.....	43

# *Introduction*

## Introduction :

Autrefois les plantes médicinales étaient l'une des seules sources de guérisons des maladies (Beloued, 1998). L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques remonte aux temps les plus reculés, mais ce n'est qu'à partir du 9<sup>ème</sup> siècle, que la médecine scientifique a commencé à s'intéresser aux effets physiologiques, mais aussi de toxicité (Zellagui, 2001).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie pharmaceutique, toxicologique, cosmétologique.... Parmi ces composés on trouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo et in vitro* de tissus végétaux ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, antioxydants,..... (Bruneton, 1993).

Notre organisme est, en permanence, soumis à un stress oxydant susceptible d'endommager les mitochondries des différentes cellules dans différents organes tels que le foie, le cœur le système nerveux....., et d'induire des pathologies diverses telles que les tumeurs, athérosclérose, la dégénérescence nerveuse, le diabète,... En effet, la vie cellulaire est une source permanente d'espèces oxygénées réactives et de radicaux libres. Différents mécanismes de protection endogènes : enzymes, protéines, limitent néanmoins ces effets délétères. Ces défenses sont aussi renforcées par un apport alimentaire d'origine végétale, de divers antioxydants : vitamine C, vitamine A, vitamine E, polyphénols,... (Gutteridge et Halliwell, 1994).

En effet, il s'avère que les polyphénols sont des composés du métabolisme secondaire des plantes à vertus thérapeutiques importantes ( Bruneton, 1993). Il est prépondérant donc d'investir ce potentiel notamment en tant qu'éboueurs des radicaux libres oxygénés et savoir également les mécanismes de leur scavenging des oxydants.

Pour cela, nous nous sommes fixés un modèle pathologique expérimental de l'hépatotoxicité induite par un hépatotoxique puissant : un médicament anticancéreux à savoir, Epirubicine.

Notre travail donc consiste en :

- La mise en évidence de l'effet hépato-toxique de l'Epirubicine.
- L'étude de l'effet préventif des polyphénols extraits de la plante *Ranunculus repens* L, dans le cas du modèle expérimental choisi.
- L'étude de l'activité antioxydante des polyphénols dans cette hépatotoxicité.

*Etude*  
*Bibliographique*

# *Chapitre I*

*La plante RRL*

*et polyphénols*

## I- La plante *Ranunculus repens* L et polyphénols

### I-1 –La plante *Ranunculus repens* L :

#### I-1-1-Introduction :

La plante est un réservoir de principes actifs (Verlags et Konemann, 1999) elle est dite médicinale lorsque « au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses » (Bruneton, 1993).

Les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal voire l'unique recours du médecin, en même temps que la matière première pour la fabrication de remèdes pharmaceutiques (Grund, 1986) parmi ces plantes *ranunculus repens* L (RRL).

#### I-1-2- Définition de la plante *Ranunculus repens* L :

Est une espèce vivace herbacée, généralement duveteuse à longs stolons rampants, les feuilles triangulaires ont trois dentés, celui du milieu étant pétiolé, les fleurs ont cinq pétales jaunes, cinq sépales dressés et beaucoup d'étamines, le réceptacle porte de nombreux carpelles qui à maturité donnent des akènes à bec grêle (Gerard et Camille, 2003). Les *ranunculus* aussi appelés « bouton d'or » (Pierre, 2000) (Figure01).

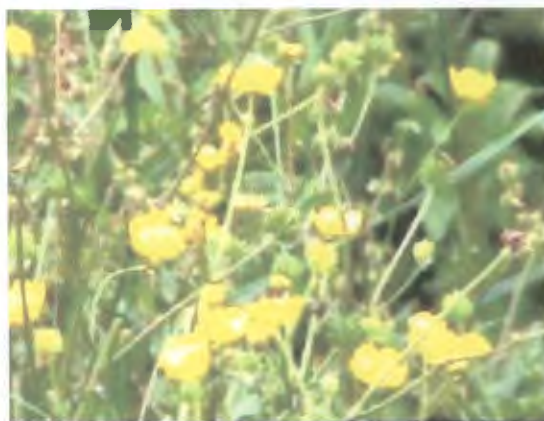


Fig.(01) :La plante *Ranunculus repens* L.

#### I-1-3- Systématique :

- ❖ Phylum : *Dictotylédone*.
- ❖ Famille : *Ranunculaceae*.
- ❖ Ordre : *Ranale* ou polycarpique .
- ❖ Genre : *Ranunculus*.
- ❖ Espèce : *Ranunculus repens* L.
- ❖ Nom arabe : Mergheris (El-houdane).
- ❖ Nom commun : *Ranunculus* rampante (581/BEV) .

**I-1-4- Biologie du *Ranunculus repens* L :**

La *ranunculus repens* est une herbe rampante avec des racines fibreuses, elle est commune dans les pâturages, champs et dans les zones humides aux climats tempérés. Elle produit de nouvelles plantes ou clones et se développe à travers les stolons qui se développent dans les aisselles des feuilles. Au printemps des stolons latéraux sont produits dans les feuilles et la production de stolons continue jusqu'à la fin de l'été. Un à deux stolons par plante sont communs mais il y a des plantes qui peuvent avoir jusqu'à cinq et des branches secondaires peuvent se produire aussi bien (Holm et al, 1997). En automne quand les rameaux sont établis le stolon devient pâle et meurt laissant des rosettes physiologiquement indépendantes se développer et deviennent des fleurs, la saison prochaine pendant que la plante originale, pâlit et meurt, la nouvelle plante peut persister durant l'hiver comme une petite rosette. Le court caudex stocke les matières nutritives qui permettent l'accélération de la croissance en printemps entre Avril et Juin (Sarukhan, 1976). Une enquête révélait que chaque fleur produisait vingt au moins de graines. En Ontario la saison de fleurs est d'Avril à Juillet (Alex, 2001) et cette floraison en début d'été et suivit de fruit en deux semaines. La *Ranunculus repens* est résistante à la gelée et survit au sécheresse modérée (Holm et al, 1976). Les diverses *Ranunculus* contiennent un hétéroside de lactone, le ranunculoside, qui par hydrolyse libère de la protoanémone, extrêmement vésicante ([http : //www .plantes- comestibles.com/ plante.php? ID:2 bouton d'or](http://www.plantes-comestibles.com/plante.php?ID:2))

**I-2- Les polyphénols****I-2-1- Définition :**

Les polyphénols sont des métabolites secondaires issus de végétaux (Bruneton, 1993) , possèdent plusieurs groupements phénoliques avec ou non d'autres fonctions (OH alcoolique, carboxyle). Dans cette catégorie, on trouve de nombreuses substances : Les noyaux simples en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> et C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, les noyaux dérivant de l'extension du phényl propane en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> comme les flavonoïdes (Dubois et al, 1977).

**I-2-2- Classification des polyphénols :**

On les répartit en différentes classes en fonction de la nature de leur squelette carboné, les deux plus importantes sont les flavonoïdes et les tanins.

**I-2-2-1- Les flavonoïdes :**

Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux, presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Bruneton, 1993).



- **Structure chimique :**

Le squelette de base des flavonoïdes à 15 atomes de carbone et constitué de deux cycles (A et B), reliés par une chaîne en C<sub>2</sub>, cette structure est représentée par la figure (02) :

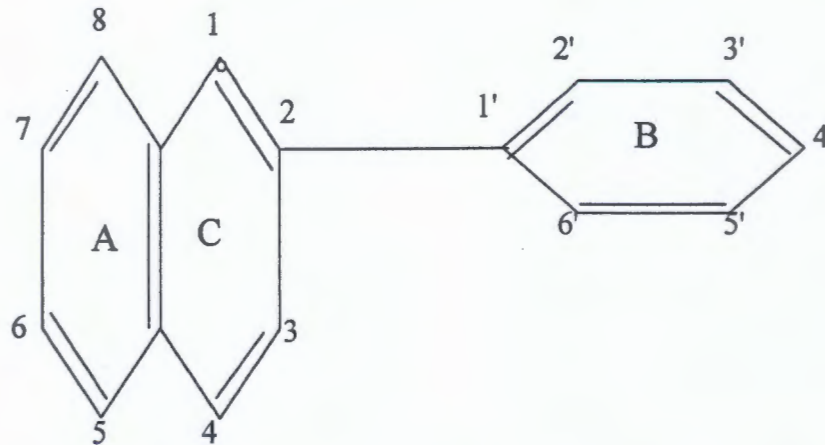


Fig. 02 : Squelette de base des flavonoïdes (Bruneton,1993).

- **Classification :**

Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central à savoir: 2-phényl benzo pyriliiums : anthocyanes ; 2-phényl chromones: flavones, flavonols, flavonones et dihydro flavonols, isoflavonones...etc. ; 2-phénylcromane flavones, chalcones, et dihydrochalcones...etc.; 2-benzylidène coumaranones (=aurones) (Bruneton, 1993).

- **Rôle pharmacologique :**

Les flavonoïdes ont le potentiel antioxydant (scavengers des radicaux libres), aussi sont des inhibiteurs de la peroxydation lipidique ([http : // phyto-vie, site voila.fr/page2, html](http://phyto-vie.sitevoila.fr/page2.html)), ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antivirales et protègent le foie (Amillec et Gerard, 2003).

#### I-2-2-2- Les tanins :

Composés phénoliques que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres, les fruits (raisin, café...) et les feuilles de thé (<http://membres.lycos.fr/jjww/tanins.htm>).

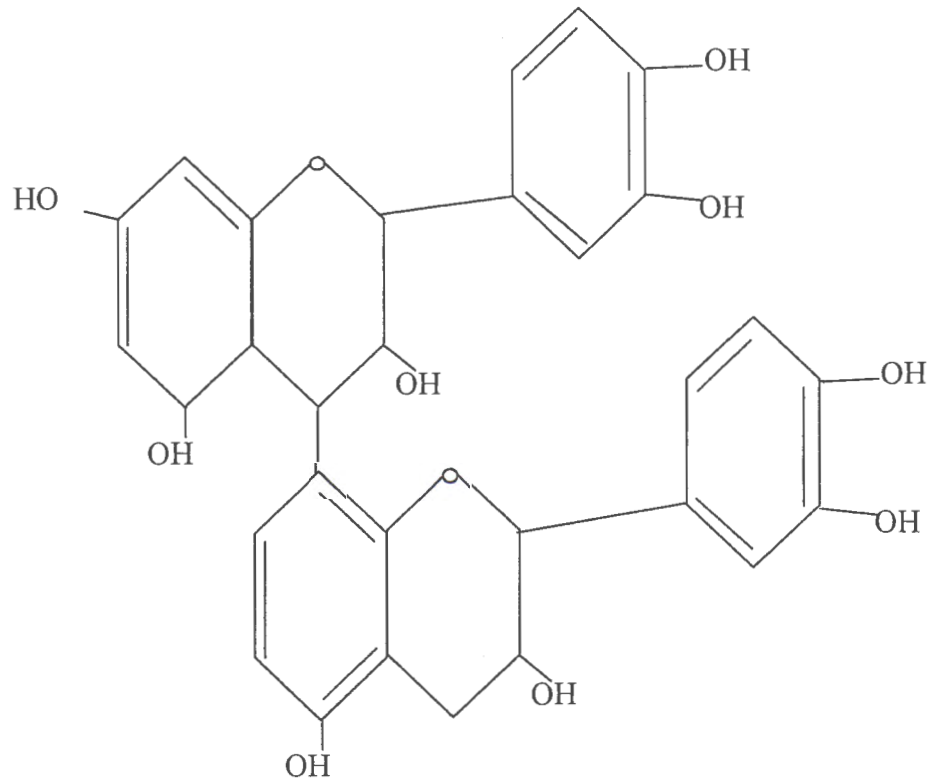
La structure chimique de ces polyphénols leur confère une capacité très développée à se fixer sur toutes sortes de molécules, essentiellement les protéines.

- **Classification :**

Les tanins sont divisés en deux groupes :

**- Les tanins condensés :**

Sont des proanthocyanidines, composées phénoliques hétérogènes, oligomère et polymères de Flavones, de 3-flavonols, de 5-deoxy-3 flavonols et de 3, 4- flavonediols. ([http:// membre. Lycos.fr/jj www/tanins.htm](http://membre.Lycos.fr/jjwww/tanins.htm) (Figure03)).



**Fig. 03 :** Structure de proanthocyanidines.

**- Les tanins hydrolysables :**

Ce sont des esters d'un sucre « glucose » ou d'un polyol apparenté et d'un nombre variable de molécules d'acide phénol « acide gallique » dans le cas des tanins galliques, ou acide hexahydroxydiphénique « HHDP » dans le cas des tanins éllagiques (Bruneton, 1993).

• **Rôle des tanins :**

- **Tanins proanthocyanidines :** Ce sont des antioxydants (Bohorun et *al*, 1994; Bohorun, 1996), antitumorales (Deoliveira et *al*, 1972; Brownlee et *al*, 1992), antifongiques, anti- inflammatoires (Kreofesky et *al*, 1992) aussi ils possèdent des effets stabilisant sur le collagène (Masquelier et *al*, 1979).

- **Tanins galliques et catéchiques :** Ce sont des antioxydants (Okuda et *al*, 1983).

# *Chapitre II*

## *La mitochondrie et stress oxydant*

## II- La mitochondrie et le stress oxydant :

### II-1- la mitochondrie :

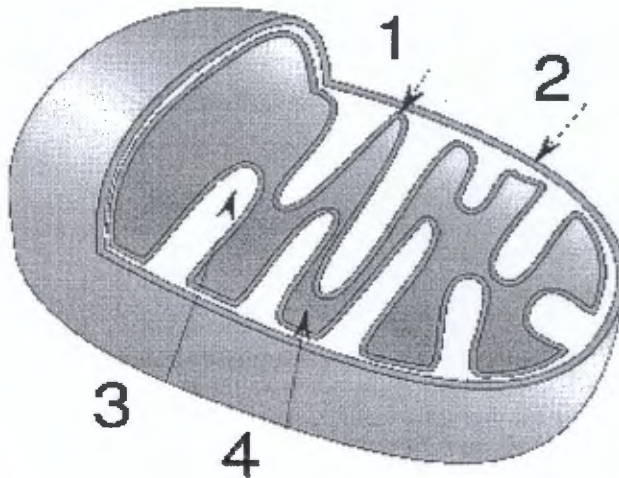
#### II-1-1- Définition :

La mitochondrie constitue le groupe des organites à double membrane. Elle présente une lumière centrale : la matrice contenant l'ADN. La mitochondrie renferme aussi:

- ❖ Une membrane externe : formée de 40% de lipides sont surtout des phospholipides avec un peu de cholestérol, et 60% des protéines sont surtout des enzymes. La membrane externe est perméable à tous les métabolismes et coenzymes dont le poids moléculaire est inférieur à 10 KDa.
- ❖ Une membrane interne : formée par 20% des lipides : représentés surtout par des phospholipides et peu de cholestérol, et 80% de protéine qui peuvent classées en 3 groupes :

Les transporteurs de métabolites, les constituants de la chaîne respiratoire (20% des protéines sont des cytochromes) et l'ATP synthétase.

La mitochondrie présente aussi un espace intermembranaire. Il est présenté dans toutes les cellules eucaryotes, leur taille varie de 0,25 à 1 $\mu$ , plutôt que leur nombre variable. (Bensalem, 1994) (Figure 04).



- 1 : membrane interne.
- 2 : membrane externe.
- 3 : espace inter-membranaire.
- 4 : matrice.

**Fig.04** : Description de la structure mitochondriale.  
(<http://fr.wikipedia.org/wiki/Image:Mitochondrie.svg>)

## II-1-2- Rôle physiologique de la mitochondrie :

- **La respiration cellulaire :**

L'oxydation complète des divers composés provenant de la dégradation des nutriments (lipides, glucides et protéines) s'effectue dans la mitochondrie et elle permet de produire 90% de l'ATP cellulaire, notamment par la phosphorylation oxydative s'opérant au niveau de la chaîne respiratoire lors du transfert du potentiel réducteur obtenu surtout dans le cycle de Krebs (Bensalem, 1994).

- Transport des électrons par la chaîne respiratoire :**

La chaîne respiratoire est composée de cinq complexes protéiques membranaires appelés complexes I, II, III, IV, et V situés dans la membrane interne de la mitochondrie (Braun et al, 1992) (Figure 05).

- **Le complexe I : (ou NADH ubiquinone oxydoréductase)**

Ce complexe permet l'oxydation du NADH fourni par le cycle de Krebs en  $\text{NAD}^+$ , cette réaction est accompagnée d'un transfert d'électrons à l'ubiquinone et de protons vers l'espace intermembranaire, l'enzyme principale de ce complexe I est la NADH,  $\text{H}^+$  déshydrogénase, cette enzyme est inhibée par l'Amytal, la roténone et la piéricidine, l'un de ces composés inhibe le transport des électrons dans le complexe I (Braun et al, 1992) (Figure 06).

- **Le complexe II : (ou succinate : ubiquinone oxydoréductase ou succinate déshydrogénase)**

C'est un composant du cycle de Krebs qui permet l'oxydation du succinate en fumarate accompagnée d'un transfert d'électrons à l'ubiquinone ainsi que la réduction du FAD en  $\text{FADH}_2$  le complexe II ne transfère pas de protons vers l'espace intermembranaire, l'enzyme principale de ce complexe II est la succinate déshydrogénase. L'inhibiteur de complexe II est le Malonate (Braun et al, 1992) (Figure 07).

- **Le complexe III : (ou ubiquinone cytochrome C oxydoréductase ou cytochrome bc1) :**

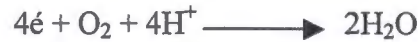
Ce complexe permet le transfert d'électrons de l'ubiquinone ou cytochrome C accompagné de la réduction l'oxygène en eau et de la translocation de protons vers l'espace intermembranaire, le transfert des électrons dans ce complexe est spontané, il est inhibé par l'ANTIMYCINE A (Braun et al, 1992) (Figure 08).

- **Le complexe IV (ou cytochrome c oxydase) :**

C'est l'accepteur final d'électrons, l'oxydation du cytochrome c se couple à un transfert de protons vers l'espace intermembranaire et à la réduction de l'oxygène en eau, le transfert d'électrons est inhibé par l'azide, par le CO et par les cyanures (Braun et al, 1992) (Figure 09).

□ **Le complexe V : (ou F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> ATP synthétase) :**

Ce complexe utilise le gradient électrochimique généré par la translocation de protons de complexe I, III et IV pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Il est composé d'un corps membranaire F<sub>0</sub> et d'une tête soluble F<sub>1</sub> (Braun et *al*, 1992) (Figure10). Le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire jusqu'à l'oxygène permet la production d'eau :



La chute importante du potentiel redox à travers les complexes de transporteurs libère l'énergie nécessaire au pompage des protons, le mouvement de protons à travers la membrane interne à 3 conséquences :

- ✓ Il crée un gradient de pH de part et d'autre de la membrane interne la matrice est alcaline, l'espace intermembranaire acide.
- ✓ Il crée un gradient chimique pour les protons qui sont moins concentrés dans la matrice mitochondriale que dans l'espace intermembranaire ou dans le cytosol.
- ✓ Il crée un gradient électrique avec accumulation de charges positives sur la face externe de la membrane interne et des charges négatives (OH<sup>-</sup>) sur sa face matricielle. La résultante de ces gradients est une force électrochimique qui tend à faire entrer les protons dans la matrice mitochondriale (Bensalem, 1994).

• **Phosphorylation de l'ADP par l'ATP synthétase :**

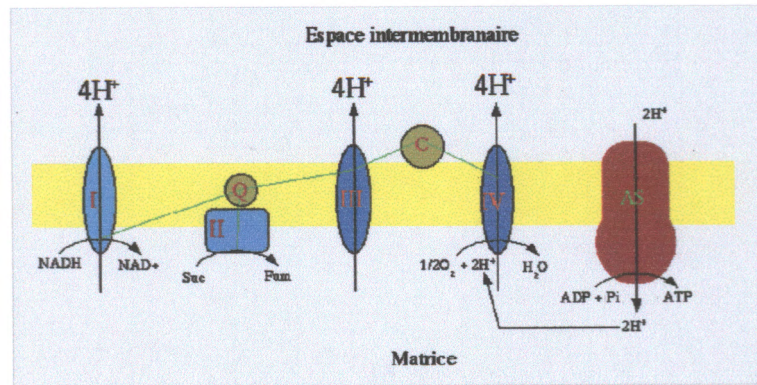
La membrane interne étant imperméable aux protons ceux-ci sont contraints de passer par l'ATPase (F<sub>0</sub> et F<sub>1</sub>) qui lui ménage un canal, la force de décompression ou force protons-matrice, est utilisée par l'ATP synthétase qui crée une liaison riche en énergie sous forme d'ATP. L'ATPase se comporte comme un canal à protons capable de convertir l'énergie électrochimique en liaison phosphodiester on pense que la phosphorylation d'un ADP exige le passage de 3 protons, ce couplage est réversible, l'ATPase peut fonctionner comme une pompe à protons qui utilise l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP (Bensalem, 1994).

▪ **Rendement énergétique de la respiration cellulaire :**

Le rendement globale peut être calculé à partir d'une molécule de nutriment, glucose ou acide gras, dans ce cas une molécule de glucose qui forme 2 pyruvate puis 2 Acétyl CoA passant dans le cycle de Krebs permettra la formation de 38 ATP. Alors que l'oxydation d'un acide gras comme le palmitate par exemple permet la formation de près de 120 ATP (Bensalem, 1994).

**Remarque :**

Il y a d'autres rôles physiologiques de la mitochondrie qui sont : La production de précurseurs pour diverses biosynthèses, l'accumulation de diverses substances, et la synthèse des protéines (Bensalem, 1994).



**Fig. 05 :** La chaîne respiratoire.  
(<http://webiologie.free.fr/cellules/metabolisme/respiration.html>)

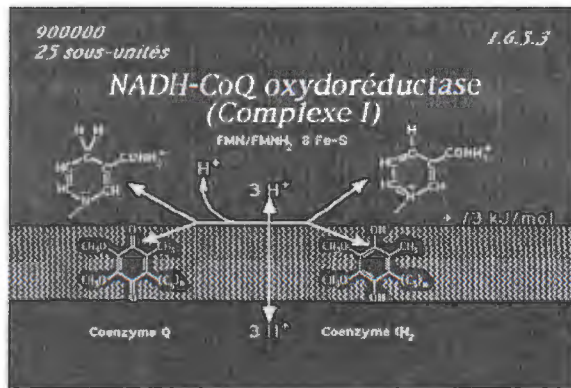


Fig. 06 : Complexe I

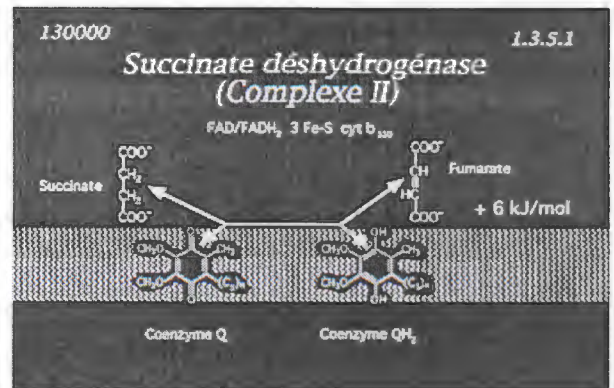


Fig. 07 : Complexe II

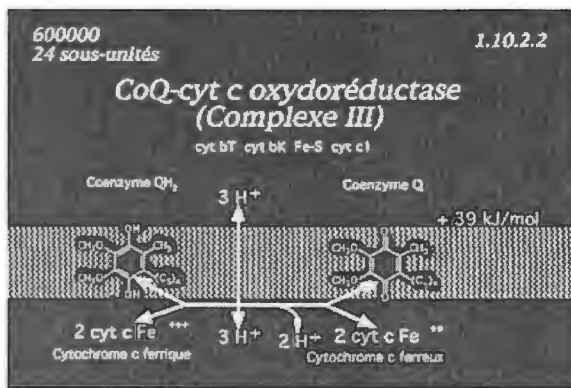


Fig.08 : Complexe III

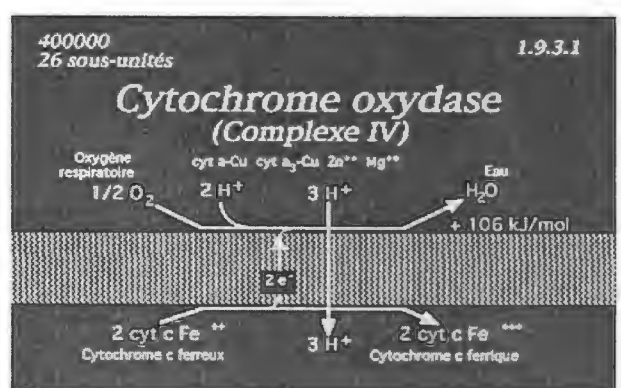


Fig.09 : Complexe IV

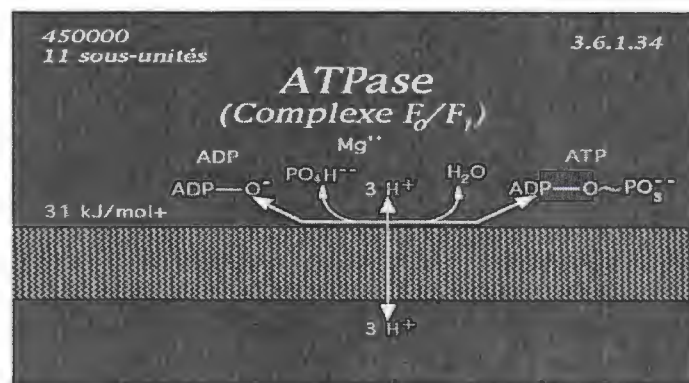


Fig.10 : Complexe V

(<http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/RMbioch/POLY.Chp.6.html>).



### II-1-3- La mitochondrie et les radicaux libres :

Au niveau des mitochondries, au cours du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire, le radical superoxyde ( $O_2^-$ ) est produit par réaction de l'oxygène avec un radical semi ubiquinone (Turrens *et al*, 1985), la production mitochondriale des radicaux libres oxygénés dépend de la disponibilité en oxygène, elle augmente avec la pression partielle en oxygène (Boveris, *et al* 1973) et diminue lorsque celle-ci baisse. Sous l'effet d'une production importante de ROS par le complexe III, le passage de calcium provoque l'ouverture d'un pore transitoire appelé MPT (mitochondrial permeability transition pore) permettant aux molécules de taille inférieure à 1.5 KDa de traverser les membranes interne et externe. Le gradient électrochimique de protons est alors perdu, ce qui provoque un gonflement de la matrice et donc la rupture de la membrane externe, c'est alors que les composés de l'espace intermembranaire sont rejetés dans le cytoplasme (Etienne, 2004).

Le relargage de cytochrome C dans le cytosol est donc toujours postérieur à une augmentation de la production de ROS, à une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium ou une inhibition de la chaîne respiratoire (Etienne, 2004).

Pour évaluer le stress oxydatif qui existe on détermine certains paramètres tel que : TGO, TGP, MDA, Glutathion, catalase : par exemple, l'augmentation de MDA est un indice de stress oxydatif (Esterbauer, 1996).

### II-2- le stress oxydant :

#### II-2-1-Définition de stress oxydant :

Le stress oxydatif correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (Morely *et al*, 1999). C'est à dire le résultat d'un déséquilibre entre la balance des pro oxydants et les systèmes de défense (antioxydants) avec comme des dégâts souvent irréversibles pour la cellule (Pincemail *et al*, 2000).

#### II-2-2- Les radicaux libres :

- **Définition :**

Un radical est un atome ou une molécule dont la structure chimique est caractérisée par la présence d'un électron libre rendant cette espèce chimique beaucoup plus réactive que l'atome où la molécule dont il (elle) est issu(e) (Curtin *et al*, 1992).

Les radicaux libres capables d'extraire un électron des molécules voisines pour compléter la vacance de leur orbital, donc sont les sous produits des réactions d'oxydation et de réduction (Olanaw, 1993; Hirsch, 1993).

Les radicaux libres se divisent en 3 catégories selon l'élément qui contient l'électron libre :

- ✓ Radicaux avec oxygène central : radical peroxyde ( $\cdot\text{O}_2$ ).
- ✓ Radicaux avec carbone central : radical tri chlorure de carbone ( $\text{CCL}_3\cdot$ ).
- ✓ Radicaux avec soufre centre. (Donet, 1991; Girroti, 1999).

- **Types des radicaux libres :**

Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde  $\cdot\text{O}_2$  et le radical hydroxyle  $\text{OH}\cdot$  ou de l'azote tel: le monoxyde d'azote  $\text{NO}\cdot$  (Yoshikawa et *al*, 2000), aussi le radical alcoxyl  $\text{RO}\cdot$  et peroxyde  $\text{ROO}\cdot$  (Favier, 1998; Clavel et *al*, 1985; Dodet, 1991).

D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène comme l'oxygène singulet  $\frac{1}{2} \text{O}_2$ , le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ou le nétroperoxyde ( $\text{ONOOH}$ ) ne sont pas des radicaux libres (Dalton et *al*, 2002), dont la toxicité est importante (Novelli, 1997) et peuvent être des précurseurs des radicaux et l'ensemble des radicaux libres et de leur précurseur est appelé espèces réactives de l'oxygène (Dalton et *al*, 2002).

- **Rôles des radicaux libres :**

Les espèces oxygénées activées ont un rôle physiologique important en agissant à faible concentration comme des messagers secondaires capables de réguler le phénomène d'apoptose qui est un suicide programmé des cellules évoluant vers un état cancéreux (Curtin et *al* , 2002), d'activer des facteurs de transcription (NFK B, p38,...) eux mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire ,(Owuor et Kong, 2002), de moduler l'expression de gènes de structure codant pour enzymes antioxydants (Holgrem,2003).

Si les EOA sont produites en quantité trop importante (Sies,1991), cette production est favorisée par divers agents aussi bien endogènes (métabolisme, inflammation, cycle redox) qu'exogènes, comme les radiations ultra violettes ionisantes, le tabagisme et diverses molécules apportées par l'alimentation (métaux toxiques, alcool), la production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines) dues au caractère cytotoxique et métagènes des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides, l'organisme peut aussi agir contre ces composés anormaux par une production d'anticorps qui malheureusement peuvent aussi être des auto- anticorps, créant une troisième vague d'attaque chimique (Esterbauer et *al*, 1992).

-Oxydation des protéines : Les dommages oxydatifs au niveau des protéines (et des acides aminés), peuvent se manifester de diverses manières : (Davies, 1987 ; Davies, 1999)

L'apparition des groupements hydroperoxydes ( $\text{OOH}$ ), oxydation du squelette carboné de la chaîne polypeptidique conduisant à une fragmentation des protéines et à l'apparition de groupement carbonyle. L'oxydation des chaînes latérales des acides aminés avec formation des ponts disulfures de méthionine sulfoxyde, certains acides aminés (phe, Tyr, His) subissent un processus d'hydroxylation qui génère la formation d'ortho, et de méta, par exemple, lors de l'oxydation de la tyrosine il y'a dimérisation de deux radicaux tyrosyl conduisant à la formation de dityrosine (Pantke et al, 1999). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur) et deviennent plus sensibles à l'action des protéases, aussi très hydrophobes, elles vont alors former des amas, associés aux lipides forment les dépôts des lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier et al, 1995).

- Oxydation des glucides : le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques en présence des traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, ce phénomène contribue à la fragilité des parois vasculaires et la rétine chez les diabétiques (Favier et al, 1995) aussi par auto- oxydation, le glucose produit d'EOA et de glyoxal, ce dernier fixé sur le groupement aminé des protéines avec comme conséquence l'apparition de résidus carboxyméthyl-lysine ceux ci ont la capacité de fixer le cuivre et d'induire un processus de peroxydation lipidique (Kalousova et al, 2002).

- Oxydation des acides nucléiques : au niveau de l'ADN, le stress oxydatif provoque de nombreuses modifications structurales (mutations, coupures, pontage covalent des protéines) (Cooke et al, 2001), par exemple : la guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy 2 déoxyguanosine (8-HO,dG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN, si ces systèmes sont défaillant la 8-HO, dG s'accumulera au sein de l'ADN causant ainsi des mutations impliquées dans le développement du cancer (Borek, 1997), les radicaux libres permettant la formation de liaison covalent ADN-protéine (Davies, 2003).

- Oxydation des lipides : les lipides et principalement leurs acides gras poly insaturés des membranes cellulaires sont la cible principale des espèces oxygénées activées (Meagher et al, 2000) et surtout par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux double liaisons pour former un radical diène conjugué oxydé en radical peroxyde cette réaction appelée **peroxydation lipidique**. (Esterbauer et al, 1992)

Les EOA peuvent aussi interagir directement avec les acides gras pour former la 8 épiprostaglandine appartenant à la famille des isoprostanes (Reilly et al, 1996). Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulants : aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui, captées par des macrophages formeront le dépôt

lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires où l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane (Cadet et al, 2002).

- Mécanisme de la peroxydation lipidique : La peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne qui forme un nouveau radical diène conjugué (Esterbauer et al, 1992), le radical peroxyde après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule peut libérer différentes aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde ou l'hydroxynonanal, (Cadet et al, 2002). Ces derniers réagissent avec des antioxydants comme le glutathion augmente le stress radicalaire, mais aussi leur détoxification (Agarwal et al, 1994), les étapes de la peroxydation lipidique sont illustrés dans la figure (11) :

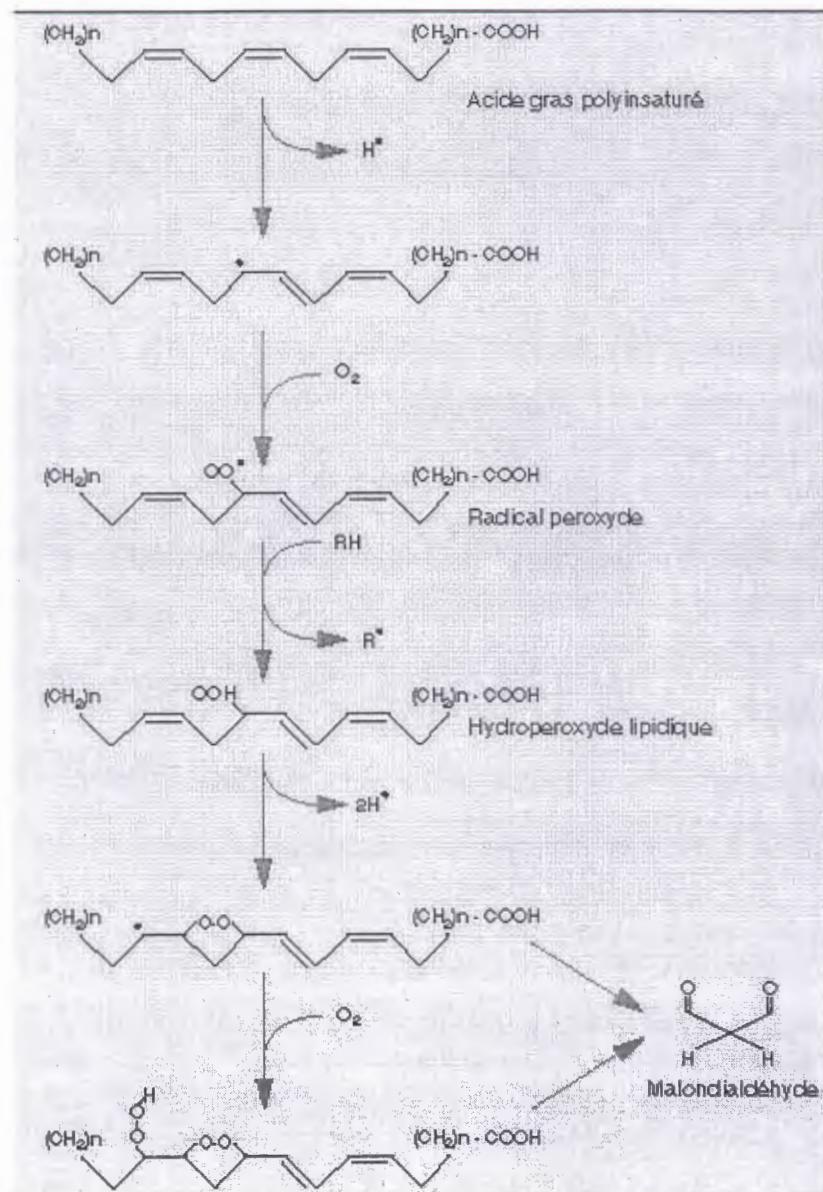


Fig. 11 : Peroxydation lipidique: La voie de synthèse du malonedialdehyde à partir des acides gras.

(<http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues-bio-rech/abc/e-docs/00/00/C5/C1/article...>).

-Le **malonedialdehyde** :Il s'agit d'un corps qui par ces deux fonctions aldéhydes très réactives, lie transversalement les lipides, l'ADN et les protéines à l'intérieur des cellules, ces derniers se trouvent ainsi figés et entraînent le ralentissement des échanges et des processus métaboliques, les modifications des protéines de structure du tissu conjonctif entraînent une augmentation des pontages entre les molécules ce qui perturbe la circulation des nutriments à travers la matrice extracellulaire (Jadot, 1994).

### II-2-3- Les antioxydants :

- **Définition :**

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat.

Les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation des radicaux libres oxygénés (antioxydants primaires) ou en épurant les radicaux libres oxygénés (antioxydants secondaires) (Buettner et Jurkiewicz, 1996 ; Herbert et al, 1996).

- **Types d'antioxydants :**

Les systèmes de défense se composent :

- ✓ D'enzymes (superoxydes dismutases au Zn et Mn, catalase, glutathion peroxydase, couple thiorédoxine, thiorédoxineréductase, hème oxygénase).
- ✓ De protéines transporteuses du Fer et du cuivre (transferrine, ~~transferrine~~ céruléoplasmine).
- ✓ De molécule antioxydante de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, glucose, vitamines A, C, E, Ubiquinone, caroténoïdes, flavonoïdes).
- ✓ D'oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium) indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes (Sies, 1991).

Donc, les cellules utilisent de nombreuses stratégies et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène (Kinsky, 1989). Cette stratégie est illustrée à travers les différentes actions de ces antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, à savoir:

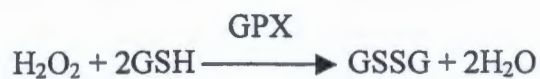
- **Les antioxydants enzymatiques :**

**Superoxydes dismutases : (SOD) :** Cette enzyme assure l'élimination de l'anion superoxyde, le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD), protègent les mitochondries, des superoxydes à cuivre-Zinc protégeant le cytosol, la face externe de

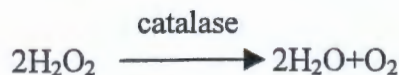
membrane des cellules endothéliales ou le plasma sanguin (Pincemail et *al*, 1999; Levine et Kidd, 1996; Ganther, 1999), la réaction qui est catalysée par le SOD est la suivante :



**La glutathion peroxydase (GPX) :** Cette enzyme a besoin du glutathion et du sélénium pour fonctionner correctement, son rôle principal est d'éliminer les peroxydes lipidiques. La régulation peroxydase seléno-dépendante se comportera de deux façons différentes faces au stress oxydant : surexpression de l'enzyme dans un premier temps puis destruction si le stress oxydant perdure de manière permanente. (Néve et *al*, 1989), le mécanisme réactionnel est le suivant :



**Catalase :** C'est un tétra élément composé de 4 sous unités, son rôle est d'accélérer la transformation du peroxyde d'hydrogène, en eau et en dioxygène, la catalase a une forte concentration dans le foie et les globules rouges (Favier, 1998), leur mécanisme réactionnel est le suivant :



La catalase peut être inhibée par la cyanide et l'azide (Deshpande et *al*, 1996).

**Les thiorédoxines (TRX) et la thiorédoxine réductase (TRXR) :** Les thiorédoxines sont des enzymes à activité antioxydante intrinsèque comme toutes les protéines à groupement thiol SH (Hattori et *al*, 2003; Moran et *al*, 2001), une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase, cette dernière possède un groupement sélénocysteine dans son site actif, la TRXR intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Ryter et Tyrell, 2000).

**L' hème oxygénase (HO) :** L'hème oxygénase permet la conversion de l'hème en monoxyde de carbone en biliverdine et en fer, l'effet protecteur de l'HO contre le stress oxydant et indirect puis qu'il est relié au fait que une fois formée, la biliverdine se transforme en bilirubine qui possède de puissante activité antioxydante (Ryter et Tyrell, 2000).

□ **Les antioxydants non enzymatiques :**

**Vitamine E :** Est regroupée dans la famille des tocophérols, (EL-Sohemy et *al*, 2002), la transformation enchaînée de la réaction de peroxydation lipidique est stoppée par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes (Cadet et *al*, 2002).

**Vitamine C :** La vitamine C ou acide ascorbique n'est pas synthétisé par l'organisme c'est un excellent piègeur des EAO, aux concentration physiologiques la vitamine C est capable d'empêcher l'oxydation des LDL, lors de son oxydation en acide déhydroascorbique elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascokbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (Gey et *al*, 1987).

**Les caroténoïdes :** La plus part des caroténoïdes et vitamine E interagissent avec l'oxygène singulet et peuvent aussi empêcher l'oxydation du plusieurs substrats biologiques (Gey et *al*, 1993). Parmi d'autre caroténoïdes, citons également le lycopène présent dans la peau de la tomate (Rissanen et *al*, 2003).

Donc les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone) ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en ions stables (Kinsky, 1989).

De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes, phytates (Bors et *al*, 1990).

□ **Oligo-éléments :**

**sélénium :** Il participe au processus de défense contre les EOA comme cofacteur de la glutathion peroxydase, plusieurs grandes études ont montré que des concentration sériques en sélénium inférieures à 45 –50µg/L sont associés avec l'apparition des pathologies coronariennes (Salonen et *al*, 1982; Pucheu et *al*, 1995; Cenac et *al*, 1996).

**Le zinc :** Est un cofacteur essentiels de la SOD, le zinc peut inhiber partiellement les réactions de formation d'espèces oxygènes induites par le fer ou le cuivre (Mezzetti et *al*, 1998).

**Le cuivre :** Cet oligo-élément est un cofacteur essentiel de la SOD (Del Corso et *al*, 2000).

# *Chapitre III*

## *L'hépatotoxicité*



### III- L'hépatotoxicité :

- **Définition:** L'hépatotoxicité se définit tout simplement par le pouvoir destructeur envers les cellules du foie (Marcel et Valery, 1992).

#### III -2- Sémiologie hépatique dans le cas de l'hépatotoxicité :

##### III -2-1- Les transaminases :

Les deux transaminases, AST et ALT, sont considérées parmi les plus anciens paramètres enzymatiques : Elles sont aujourd'hui les plus demandées (Serge, 1982).

- **Aspartate aminotransférase (AST) :** Est une transaminase également connue sous le nom de glutamate oxaloacétate transaminase (TGO). Elle catalyse le transfert du groupe aminé du L-aspartate vers l'  $\alpha$ -cétoglutarate pour donner du L-glutamate.

L'AST est présente dans de nombreux tissus, les plus importants étant rencontrés au niveau du cœur, des muscles squelettiques, du foie et des reins (Henderson et Moss, 2001; Ward et Cockayne, 1993).

- **Alanine aminotransférase (ALT) :** Est une transaminase également connue sous le nom de glutamate - pyruvate – transaminase (TGP). L'ALT catalyse le transfert du groupe aminé de la L-alanine vers l'  $\alpha$ -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. Le niveau sérique en ALT peut être diminué en cas d'insuffisance en vitamine B6 (Henderson et Moss, 2001; Ward et Cockayne, 1993).

Les activités des AST et ALT dans les globules rouges sont respectivement de 15 et de 7 fois supérieures à celle du plasma. Il faut donc éviter l'utilisation de tout sérum hémolysé (Benhamou et al, 2000).

##### III-2-2- La bilirubine :

La bilirubine est un pigment issu de la dégradation des globules rouges du sang. L'augmentation de la bilirubine conjuguée dans le sang traduit un défaut de l'excrétion biliaire, mais aussi d'une obstruction des voies biliaires indépendante de toutes hépatite (Thomas, 1998).

##### III-2-3- Les phosphatases alcalines :

Tout comme celle de la bilirubine, la mesure de ces enzymes permet de contrôler l'évacuation biliaire (Thomas, 1998).

### III -3- L'induction de l'hépatotoxicité:

L'hépatotoxicité pouvant être induite par plusieurs facteurs: alimentaires, médicamenteux et chimique, microbiens.... nous nous limitons dans cet abrégé sur l'hépatotoxicité à évoquer l'Epirubicine (un anticancéreux)  $CCl_4$ .

- **L'Epirubicine :**

C'est un anticancéreux, immunosuppresseur cytostatique, agent intercalant, l'Epirubicine appartient au groupe des antibiotiques antracyclines, son nom commercial est Farmorubicine (Vidal, 2000).

- **Mode d'action de l'Epirubicine:**

L'Epirubicine est administrée par voie intraveineuse stricte, généralement en association (Michel, 1989), la posologie moyenne de 40 à 100 mg/m<sup>2</sup> par cycle (Vidal, 2000). Son mécanisme d'action dépend à la fois d'une liaison intercalant classique, dont la constante d'affinité pour l'ADN est relativement élevée (Michel, 1989), elle inhibe l'action des polymérase des acides nucléiques, (Vidal, 2000), d'une liaison à la topoisomérase II, d'une action membranaire et comme elle est appartient au groupe des antracyclines, elle possède une fonction semi quinone et / ou déglycosylée lors du métabolisme peut être génératrice de radicaux libres (Michel, 1989).

- **Le Tétrachlorure de carbone ( $CCl_4$ ) :**

Le  $CCl_4$  a été la molécule la plus étudiée (Sharma et al, 1989 ; Poyer et al, 1980 ; Ling et Gank, 1989), c'est un halogénure d'alkyle volatile, liquide dense, clair, incolore inflammable, d'odeur caractéristique (Windholz et al, 1983).

- **Mode d'action et effets sur la santé :**

La dose administrée varie selon la voie, par exemple chez le rat 3 ml/Kg par voie intrapéritonéale (IP) (Ling et Gank, 1989) et 0,5-1,5 ml/Kg per os (Lexa et al, 1989).

Le  $CCl_4$  est facilement absorbé par le tube digestif, il diffuse de manière préférentielle dans le tissu adipeux et se retrouve en concentration plus élevée dans la moelle osseuse, le cerveau, sang, le rein et le foie (Mc Collister et al, 1951).

La blessure du foie induite par  $CCl_4$  est caractérisée par la diminution de plusieurs fonctions cellulaires (Slater et Dalaney , 1970). Les études récentes montrent que la mitochondrie elle même est capable d'activer le  $CCl_4$  (Poyer et al, 1980 ; Albano et al, 1982), qui est métabolisé dans les membranes microsomales des cellules en un radical trichlorméthyl ( $CCl_3$ ) fortement toxique, localisé dans la matrice interne de la mitochondrie provoque la peroxydation des lipides, qui se lie aux enzymes cellulaires (cytochrome p-450) (Goodenough et Levine, 1970), aux lipides et aux protéines de diverses membranes cellulaires

(Plaa,1980). Ce radical subit d'autres réactions métaboliques dont la formation de chloroforme, de chlore de carbonyle (Phosgène) et de dioxyde de carbone (Shah et *al*, 1979). L'exposition au  $CCl_4$  peut provoquer la stéatose, la nécrose et la cirrhose (Gray et *al*, 1993).

Partie pratique

Chapitre IV

Matériels  
et  
méthodes

## **IV- Matériels et méthodes :**

### **IV-1- Matériel :**

#### **IV-1-1- Les animaux :**

Nos expériences ont été réalisées sur des rats Wistar de souche albinos provenant de l'institut Pasteur d'Alger, leur poids varie entre 138-200g pendant les essais. Ces animaux sont élevés dans des cages aérées en plastique ou métallique et ont l'accès libre à l'eau et à la nourriture (croquette).

#### **IV-1-2- La plante :**

La plante R.R.L a été recueillie dans son milieu systématique (les environs de Taher, wilaya de Jijel), durant sa floraison le mois d'avril 2006.

### **IV-2- Méthode :**

#### **IV-2-1- Extraction des polyphénols :**

L'extraction a été réalisée au niveau du laboratoire de pharmacologie de la faculté des sciences de l'université de Jijel selon le protocole suivant (figure12) :

- **Le séchage :**

Après la cueillette de la plante (jeune pousse et feuilles) et le lavage par l'eau de robinet puis par l'eau distillée. Nous l'avons séché à l'air libre pendant 3 semaines, puis dans l'étuve à 37°C pendant 3 jours .

- **Le broyage :**

Nous avons fait un broyage de la plante à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine.

- **La macération :**

Nous avons mis 200 g du matériel végétal dans 1025ml d'une solution hydroéthanolique d'un pourcentage consécutif de 20% et 80% et laissé macérer pendant 6 jours.

- **La filtration:**

Elle est réalisée par une gaze, puis sur papier filtre

- **L'évaporation:**

Cette étape a pour but d'éliminer l'éthanol, nous avons passé le macérât par le rotavapore à température égale à 50°C à 120 tour/min jusqu'à l'obtention d'une petite quantité de la phase aqueuse.

- **Le dégraissage:**

Afin d'éliminer les lipides, nous avons mélangé la phase aqueuse obtenue avec le chloroforme (v/v) dans une fiole à décantation, suivie d'une décantation dans une fiole pour séparer la phase aqueuse contenant nos extraits.

- **L'affrontement par le n-butanol:**

Nous avons mélangé la phase qui est récupérée précédemment avec le n-butanol (v/v) dans une fiole, puis nous avons fait une décantation pendant 24 heures pour séparer la phase n-butanolique contenant les extraits polyphénoliques.

- **L'évaporation à sec:**

La phase n-butanolique subit à une évaporation à sec au rotavapor à 50°C pour obtenir nos extraits en poudre finalement.

- **La quantification de la poudre:**

Pour obtenir la pesée de nos extraits nous avons fait la différence entre le poids du ballon contenant la phase n-butanolique avant l'évaporation et le poids de ce même ballon après l'évaporation à sec.

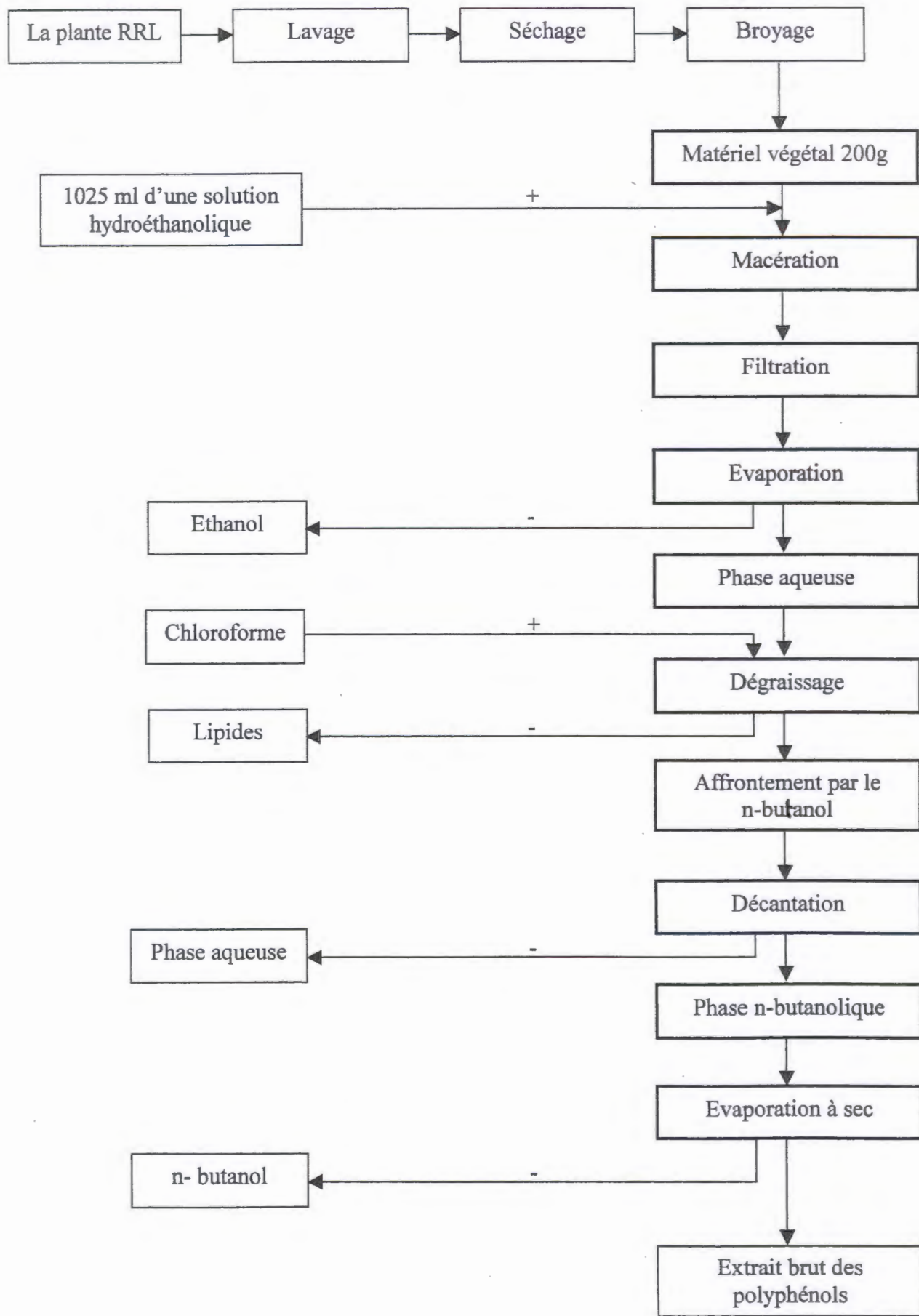


Fig. 12 : Protocole d'extraction des polyphénols (Bruneton, 1993).



**VI-2-2- Préparation des solutions administrées :**

Dans notre travail nous avons utilisés 2 préparations :

**VI -2-2-1-Solution polyphénolique :**

La posologie de la solution polyphénolique recommandée par notre encadreur, pour réaliser cette étude est de 200mg/kg sous forme d'une solution physiologique (0,9%).

Le calcul des doses thérapeutiques administrées aux rats, se fait après l'adaptation aux poids des rats, en choisissant un volume convenable à la biologie du rat (1 ml/200g de poids), à partir d'une solution mère (solution polyphénolique).

• **Préparation de la solution mère :**

Cette solution a été préparée en ajoutant, à 2g de la poudre polyphénolique, 50 ml d'eau physiologique, soit donc une solution de 40mg/ml.

$$\left. \begin{array}{l} 2\text{g} \longrightarrow 50\text{ml} \\ x\text{ g} \longrightarrow 1\text{ ml} \end{array} \right\} x = 0,04\text{g/ml} = 40\text{mg/ml}$$

• **Calcul de la masse administrée :**

Pour un rat de 200g par exemple :

$$\left. \begin{array}{l} 200\text{mg} \longrightarrow 1000\text{g} \\ x'\text{ mg} \longrightarrow 200\text{g} \end{array} \right\} x' = 40\text{mg}$$

• **Calcul du volume correspondant :**

$$\left. \begin{array}{l} 1\text{ ml} \longrightarrow 40\text{ mg} \\ y\text{ ml} \longrightarrow 40\text{ mg} \end{array} \right\} y = 1\text{ml}$$

Donc, pour un rat de poids moyen de 200g, la dose administrée est 1 ml de la solution mère, soit 40 mg de polyphénols.

**VI-2-2-2-Le médicament « épirubicine » :**

Pour induire une hépatotoxicité aiguë par l'épirubicine, la posologie recommandée dans la notice est de 75 mg/m<sup>2</sup> (posologie maximale tolérable).

• **La surface corporelle du rat :**

$$\left. \begin{array}{l} 70\text{ kg} \longrightarrow 1.87\text{m}^2 \\ 0.2\text{ kg} \longrightarrow x\text{ m}^2 \end{array} \right\} x = 0.005\text{ m}^2$$

• **Dose pour un rat de 0.005 m<sup>2</sup> :**

$$\left. \begin{array}{l} 75\text{ mg} \longrightarrow 1\text{m}^2 \\ x\text{ mg} \longrightarrow 0.005\text{m}^2 \end{array} \right\} x = 0.38\text{mg/rat du } 0.005\text{m}^2$$

- **Préparation de la solution mère :**

Cette solution a été préparée en ajoutant à 3.8mg de l'épirubicine, 10ml de l'eau physiologique.

- **Calcul de volume administré :**

$$\left. \begin{array}{l} 3.8 \text{ mg} \longrightarrow 10\text{ml} \\ 0.38 \text{ mg} \longrightarrow x \text{ ml} \end{array} \right\} x = 1\text{ml/rat de } 200 \text{ g}$$

Donc, pour un rat de 200g la dose administrée est de 1ml de la solution mère, soit 0.38mg de l'épirubicine.

**IV-2-3-Voies d'administration des différentes solutions :**

**IV-2-3-1-Par gavage gastrique :**

L'administration de la solution polyphénolique se fait par gavage gastrique selon la méthode suivante :

Nous avons utilisé l'index et la pousse pour fixer la nuque du rat 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 permet sa pénétration dans l'œsophage (figure 13).



**Fig.13 :** Voie d'administration par gavage gastrique.

**IV-2-3-2-Par voie IP :**

L'administration de l'eau physiologique et l'épirubicine se fait par voie IP :

Nous avons utilisé l'index et la pousse pour fixer la nuque du rat 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 aiguille très fine enfoncée dans la péritoine du rat sans toucher les viscères internes (figure 14).



**Fig.14 :** Voie d'administration en IP.

#### VI-2-4-Traitement des animaux :

Avant qu'ils soient, les animaux sont soumis à de nouvelles conditions pendant deux semaines afin de s'adapter aux nouvelles conditions de l'animalerie, puis nous les avons répartis en 3 lots.

- ❖ 1<sup>er</sup> lot (L<sub>1</sub>) : lot témoin négatif, contient 4 rats, reçoivent l'eau physiologique.
- ❖ 2<sup>ème</sup> lot (L<sub>2</sub>) : lot témoin positif intoxiqué, contient 4rats, reçoivent l'anticancéreux seul
- ❖ 3<sup>ème</sup> lot. (L<sub>3</sub>) : lot traité (traitement préventif), contient 4rats, reçoivent la solution polyphénolique le 1<sup>er</sup> jour, puis l'anticancéreux et polyphénols le jour suivant.

La répartition et le traitement des rats sont représentés dans le tableau (01).

**Tab.01 :**Répartition et traitement des rats .

Lots	Reçoit
Lot 1 : Témoin négatif	1 ml d'eau physiologique à J <sub>1</sub> .
Lot 2 : Témoin positif	1ml de l'épirubicine à J <sub>1</sub> .
Lot 3 : Traitement préventif	1 ml des polyphénols à -J, puis 1 ml de l'épirubicine + 1ml de polyphénols à J <sub>1</sub> .

#### IV-2-5-Prélèvement des échantillons :

##### IV-2-5-1-Prélèvement du sang :

Nous avons prélevé le sang par ponction à l'aide d'un tube capillaire dont le bout est introduit délicatement au niveau rétro-orbitaire dans le sinus carvéneux riche en sang du rat, le sang se diffuse par capillarité et sera récupéré dans des tubes contenant un anticoagulant (EDTA).

Le sang est centrifugé à 3500 tours/minute pendant 10min les sérums obtenus sont conservés dans des éprouvettes jusqu'à la réalisation des dosages des transaminases (figure15).



**Fig.15 :** Méthode de prélèvement du sang.

#### IV-2-5-2-Prélèvement du foie :

- **Sacrifice des animaux :**

Nous avons sacrifié chaque jour les rats traités pendant 4 jours, pour extraire l'organe hépatique qui va servir pour faire les dosages nécessaires.

- **Dissection :**

Les rats sont fixés sur le dos à l'aide d'épingles posées sur chaque patte, est la dissection a été faite au niveau de l'abdomen à l'aide d'une pince et une paire de ciseaux (figure 16).



**Fig.16 :** Dissection des rats.

- **Prélèvement du foie :**

Nous avons prélevé le foie à l'aide d'une pince et procéder à une homogénéisation de 1g de tissu hépatique par un homogénéateur de DOUNCE dans une solution de  $KCl$  1,15% à température  $4^{\circ}C$  en raison de 1g/3ml. L'homogénat obtenu est prêt pour le dosage du

molonedialdehyde (MDA), ainsi une homogénéisation de 1g de tissu hépatique dans 3 volumes de TCA (5%). Cet homogénat obtenu est utilisé pour le dosage du glutathion.

- **Préparation du cytosol :**

1g du foie est coupé et homogénéisé avec 3ml de KCl (1,15%) puis une centrifugation à 800 rpm pendant 15 min à 4°C, ensuite nous avons procédé en une centrifugation du surnageant à 9600 rpm pendant 45min. Le surnageant représente la source enzymatique utilisée pour le dosage de la catalase.

#### IV-2-6- L'étude de l'hépatotoxicité:

Pour évaluer la toxicité induite, nous avons dosé les paramètres suivants: TGO, TGP, MDA, Catalase et glutathion.

- **Lieu de dosage :**

Le dosage des transaminases a été réalisé au niveau du laboratoire du Dr BEKIOUA, la lecture est faite à l'aide d'un spectrophotomètre de type BIBBY Anadéol.

Le dosage de l'MDA, catalase et glutathion a été réalisé au niveau de laboratoire de pharmacologie de la faculté des sciences de l'université de Jijel. La lecture est faite à l'aide d'un spectrophotomètre de type UV mini 1240 uv-vis spectrophotometer SHIMADZU. Republic of China.

#### IV-2-6-1-Dosage des transaminases :

- **Dosage du TGO :**

- **Principe :**

Le principe du dosage du TGO basé sur la détermination colorimétriques de L-aspartate aminotransférase AST ou TGO par la méthode de Reitman et Frankel selon la réaction suivante:



L'oxaloacétate formé est dosé sous forme de son dérivé 2,4-dinitrophénylhydrazine à  $\lambda = 546\text{nm}$  (Reitman et al, 1957).

- **Réactifs utilisés :**

Le kit biomérieux permettant la détermination du TGO comporte 3 réactifs et l'expérience nécessite aussi de la soude 0.4N. Le tableau 2 représente la composition de 3 réactifs :

**Tab.02 :** Composition des différents réactifs utilisés pour la détermination du TGO.

Réactifs 1 : substrat TGO	- Tampon phosphate PH7.5    85 m mol / l. - Aspartate                            200 m mol / l. - α -cétoglutarate                    2 m mol / l.
Réactif 3 : réactif de coloration .	- 2.4 dinitrophénylhydrazine    1 m mol / l. - Hcl    0,1 l / l.
Réactif 4 : étalon	- pyruvate.

- **Protocole d'évaluation de TGO :** Le dosage de TGO est effectué selon la méthode résumée dans le tableau (03).

**Tab .03 :** Etapes de la réalisation du dosage du TGO.

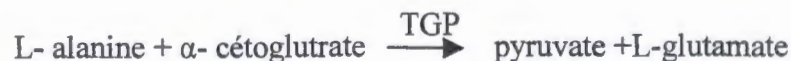
Réactifs	volume
Réactif1	1ml
Incuber 5 minutes à 37°C	
Sérum	0,2ml
Mélanger et mettre à 37°C exactement 1 heure	
Réactif 3	1 ml
Mélanger et laisser 20minutes à température ambiante	
Soude0.4N	10ml
Mélanger, attendre 5 minutes, photométrer dans les même conditions que la courbe d'étalonnage.	

Les concentrations de TGO par millilitre de sérum sont obtenues par projection des différentes densités optiques (DO) de nos échantillons sur la courbe d'étalonnage.

• **Dosage du TGP :**

- **Principe :**

Le principe du dosage du TGP basé sur la détermination de l'alanine aminotransférase ALT ou TGP par la méthode de Reitman et Frankel selon la réaction suivante :



Le pyruvate formé est dosé sous forme de son dérivé 2,4-dinitrophénylhydrazine à λ=546nm (Reitman et al, 1957).

**- Réactifs utilisés :**

Le kit biomérieux permettant la détermination du TGP comporte 3 réactifs, et l'expérience nécessite aussi du soude 0,4N. Le tableau (04) représente la composition des 3 réactifs :

**Tab.04 :** Composition des différents réactifs utilisés pour la détermination du TGP.

Réactif 2 : substrat TGP	-Tampon phosphate PH=7,5	95 m mol / l.
	-Alanine	200m mol/ l.
	- $\alpha$ -cétoglutarate	2 m mol /l.
Réactif 3	Dinitrophénylhydrazine	1 m mol/ l.
	-Hcl	1, l/ l.
Réactif 4	- pyruvate	

**- Protocole d'évaluation du TGP :** Le dosage du TGP est effectué selon la méthode résumée dans le tableau (05).

**Tab.05 :** Etapes de la réalisation du dosage du TGP.

Réactifs	volumes
Réactif 2	1 ml
Incuber 5 minutes à 37°C	
Sérum	0,2 ml
Mélanger et mettre à 37°C exactement 30 minutes	
Réactif 3	1 ml
Mélanger. laisser 20 minutes à température ambiante	
Soude 0.4N	10 ml
Mélanger, attendre 5 minutes, photométrer dans les mêmes conditions que la courbe d'étalonnage	

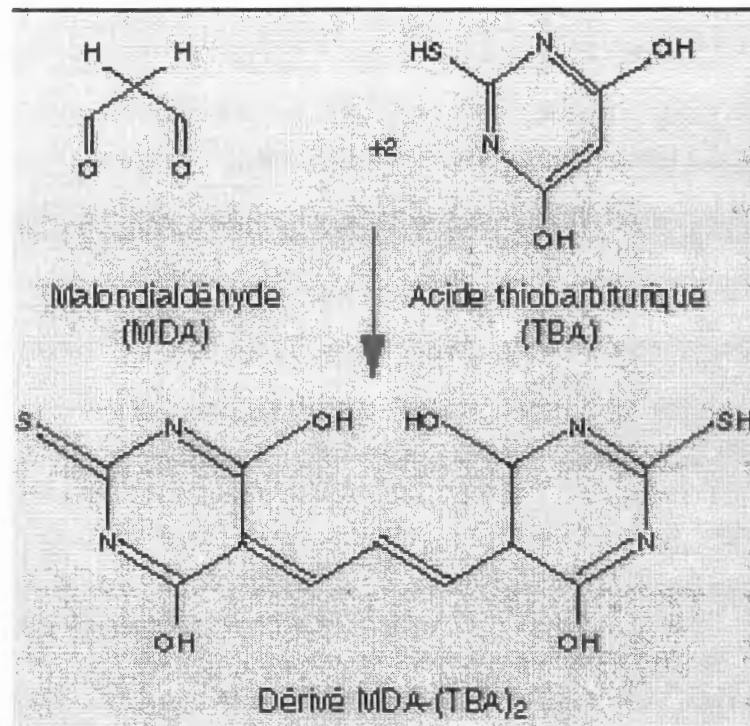
Les concentrations de TGP par millilitre de sérum sont obtenues par projection des différentes densités optiques (DO) de nos échantillons sur la courbe d'étalonnage.

• **Dosage du MDA « évaluation du stress oxydatif » :**

- **Principe :**

Le MDA réagit avec deux molécules de TBA (acide thiobarbiturique) dans un milieu acide (pH 2 à 3) et à chaud 100°C pour donner un pigment coloré en rose absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.

La méthode de Ohkawa *et al*, 1979 (Ohkawa *et al*, 1979), est utilisée pour ce dosage.



**Fig. 17 :** Réaction du malondialdéhyde avec l’acide thiobarbiturique(<http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/bio-rech/abc/e-docs/00/00/C5/article...>).

- **Réactifs utilisés :**

- Solution de KCl 1.15 %.
- Solution de TCA 20%.
- Solution de TBA 0.67%.
- Solution du n- butanol.

- **Protocole d’évaluation du MDA:** le dosage du MDA est effectué selon le protocole récapitulé dans le tableau (06).



**Tab. 06 :** Etape de la réalisation de dosage du MDA.

<b>Tubes</b>	<b>Tube blanc</b>	<b>Tube échantillon</b>
<b>Solution (ml)</b>		
Homogénat tissulaire	-	0.5
KCl (ml)	0.5	-
T C A	0.5	0.5
T B A	1	1
Incubation dans le bain marie à 100 ° c pendant 15 min après refroidissement		
n- butanol	4	4
Centrifugation a 3000 rpm pendant 15 min à 4°c		
Photométrer la phase n- butanol dans les mêmes conditions de la courbe d 'étalonnage.		

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

- **Dosage de la catalase :**

L'activité de la catalase a été déterminée en adoptant la méthode de Clairbone 1985 (Clairbone, 1985). Le principe est basé sur la disparition de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de la source enzymatique à 25°c selon la réaction suivante :



En bref, la cuve de mesure contient 1 ml de tampon phosphate ( KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M, pH7.2 ), 0.975 ml peroxyde d'hydrogène ( 0.091 M ), 0.025 ml de la source enzymatique ( le cytosol ). La lecture de la DO est effectuée à 560 nm chaque minute pendant 2 minutes.

L'activité enzymatique est exprimée en UI / g de protéine selon la relation suivante :

$$\text{UI / g de protéine} = (2.3033 / T) \times (\text{Log } A_1 / A_2) / \text{g protéine}$$

Sachant que :

A<sub>1</sub> : Absorbance au temps 0 min.

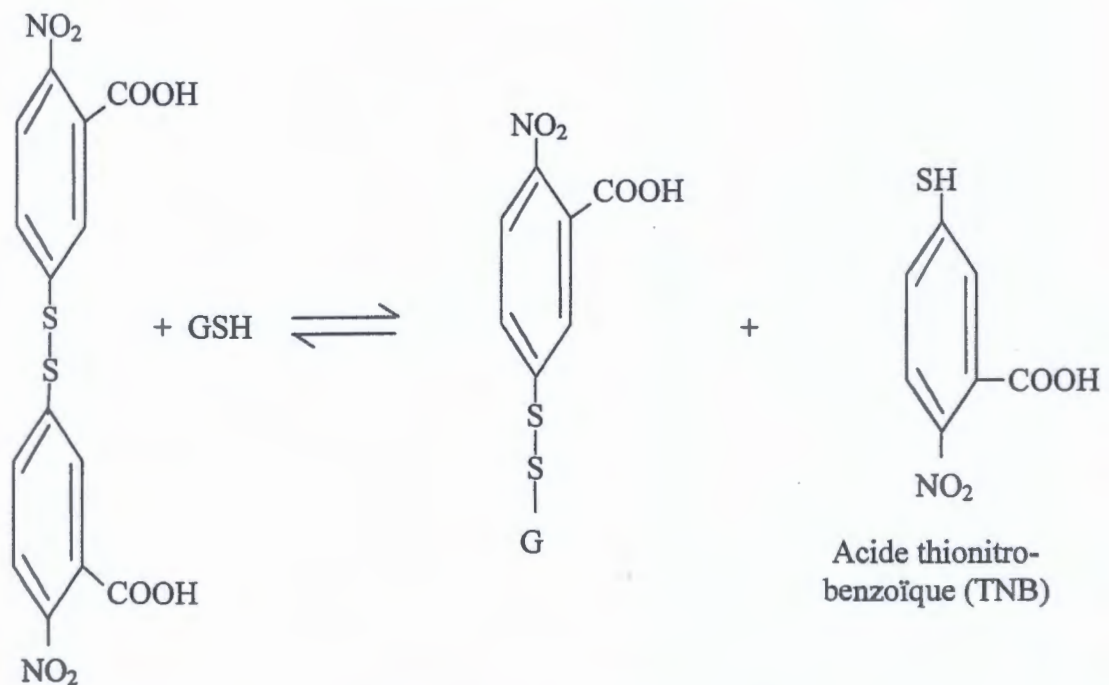
A<sub>2</sub> : absorbance après 1 min.

T : Intervalle de temps en min.

• **Dosage du glutathion hépatique :**

Le glutathion est un tripeptide composé de trois aminoacides : L'acide glutamique, la cystéine et la glycine. Il est présent dans toutes les cellules animales à des concentrations variables allant de la mitochondrie contient environ 10-12%.

Pour le dosage du GSH nous avons utilisé la méthode colorimétrique d'Ellman (Ellman, 1959) par le réactif 5,5' dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Le principe de la réaction consiste à l'oxydation du GSH par le DTNB, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH alcaline présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante :



Pour cela, 1g du foie est coupé et homogénéisé avec 3 volumes de l'acide trichloroacétique TCA (5%) à l'aide d'un broyeur ( DOUNCE). Homogénéisé et centrifugé à 2000 rpm, ensuite 50 µL du surnageant sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (0,1M, pH=8) 20 µL du DTNB (0,01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution. Après 15 min d'incubation la lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%). Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations sont exprimées en millimoles de glutathion par gramme du foie.

• **Mesure de l'effet scavenger ou piègeur des ROS (méthode au DPPH°)**

Le DPPH° (2,2 - Diphényl - 1 - picrylhydrazyl) est un radical libre stable largement utilisé pour tester la capacité antiradicalaire des composés naturels, c à d capacité des composés d'agir en tant qu'éboueurs des radicaux libres ou donneurs d'hydrogène.

La cuve de mesure contient : 1,5 ml de la solution éthanolique de DPPH° (100 µM) et 30 µl de la solution polyphénolique. La mesure de la DO s'effectue chaque 30 seconde pendant 5 min à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV mini 1240 uv-vis spectrophotometer SHIMADZU, Republic of China). L'effet piègeur est déterminé en pourcentage de réduction en prenant le 100% du contrôle (DPPH° seul) selon la relation suivante (Wahlandir et al, 1979) :

$$\% \text{ de réduction} = [A_C - A_E / A_C ] \times 100.$$

$A_C$  : Absorbance du contrôle après 5min.

$A_E$  : Absorbance de l'essai après 5min.

#### IV-3-Analyse statistique :

Les résultats numériques et graphiques sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type.

Nous avons également fait la comparaison des moyennes par le test de student, pour tester la signification de la différence entre la moyenne des deux lots et témoin. Pour cela on doit calculer la valeur de t qui est donné par la formule suivante :

$$t = \frac{|X_A - X_B|}{\sqrt{\frac{S^2}{NA} + \frac{S^2}{NB}}} \quad \text{avec} \quad S^2 = S_A^2(NA-1) + S_B^2(NB-1) + (NB-1)$$

$X_a$  = moyenne pour le lot témoin.

$X_b$  = moyenne pour le lot traité.

$|X_A - X_B|$  signifie la valeur absolue de la différence entre les deux moyennes

$N$  = le nombre de rats.

Après le calcul de t on cherche dans la table de t la valeur correspondante au degré de liberté qui est égale à  $= na + nb - 2$

La valeur trouvée par le calcul de t nous renseigne sur la signification de la différence entre le lot témoin et le lot traité selon le risque d'erreur p.

$p > 0,05$  = la différence n'est significative.

$0,05 > p > 0,01$  = la différence est significative.

$0,01 < p < 0,001$  = la différence est hautement significative.

$p < 0,001$  = la signification est très hautement significative.

Le calcul de ce test est réalisé par le logiciel Excel 6.0 et Origin.

*Chapitre V*

*Résultats*

*et*

*interprétation*

**V-Résultats et interprétation :**

Nos résultats concernent l'évaluation biochimique de toxicité au niveau de foie à partir des différentes préparations testées « dosage du TGO, TGP, MDA, catalase et glutathion ».

**V-1-Evaluation des transaminases :**

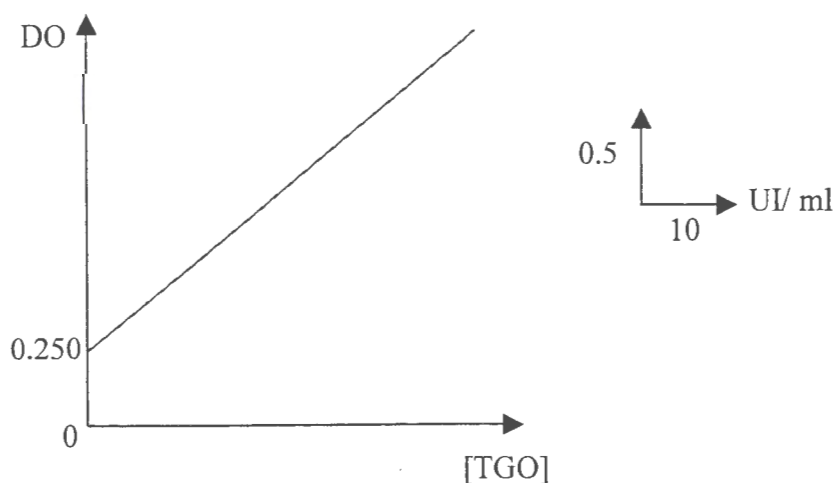
**V-1-1 Résultats des dosages du TGO :**

● **Courbe d'étalonnage :** Pour réaliser la courbe d'étalonnage du TGO (Figure 18), on doit suivre les étapes récapitulées dans le tableau (07).

**Tab.07 :** Etapes de la réalisation de la courbe d'étalonnage pour le TGO.

N° de tubes	1	2	3	4	5	6
Eau distillée (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Réactif 1 (ml)	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5
Réactif 4 (ml)	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Réactif 3 (ml)	1	1	1	1	1	1
Mélanger . Laisser 20 min ,à température ambiante.						
Sonde 0,4 N (ml)	10	10	10	10	10	10
Mélanger. Attendre 5 minutes et Photométrer.						
Unités TGO / ml	0	22	55	95	150	215

● **Etablissement de la courbe d'étalonnage**

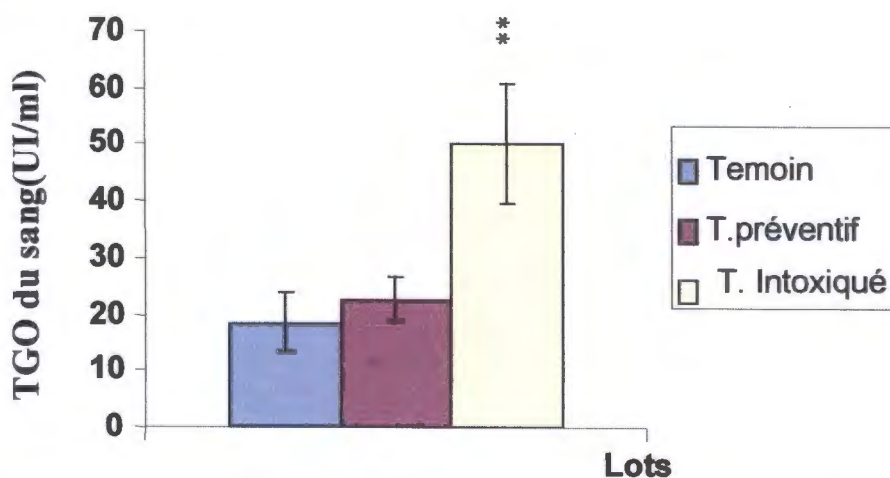


**Fig. 18 :** Courbe d'étalonnage du TGO.

Les résultats du dosage du TGO sont illustrés dans le tableau (08) et représentés en histogrammes dans la figure (19).

**Tab. 08.** Evaluation du taux du TGO en UI/ml dans le cas de différents traitements.

Lots	Rats	Résultats	Moyen ± écart type
Témoin	1	31	37 ± 5.35
	2	34	
	3	41	
	4	42	
T. préventif Ex BuOH +Epirubicine	1	35	38 ± 4.08
	2	37	
	3	44	
	4	36	
Intoxiqué (Epirubicine)	1	62	69.5 ± 10.53**
	2	59	
	3	77	
	4	80	



**Fig. 19 :** Evaluation du taux du TGO chez les différents lots. Les résultats sont présentés en Moyenne ± Ecart type . \*\* p < 0.01, la différence est hautement significative.

Nous avons constaté chez le lot intoxiqué une augmentation hautement significative (P < 0.01) qui atteint la valeur (69.5±10.53UI/ml) 24 heures après l'administration de l'épirubicine, par rapport à la valeur normale qui est apparaît chez les témoins (37±5.35UI/ml).

Pour le lot traité préventivement ( $38 \pm 4.08 \text{ UI/ml}$ ), nous constatons une augmentation non significative par rapport aux témoins.

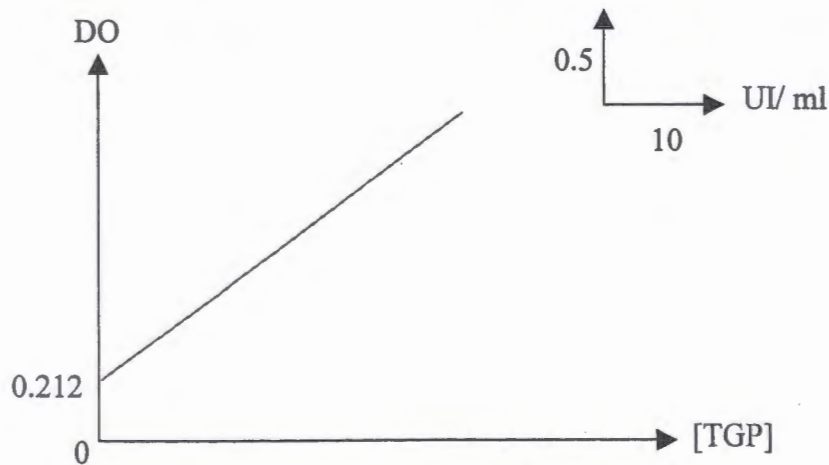
**V-1-2 Résultats des dosages du TGP :**

• **Courbe d'étalonnage :** Pour réaliser la courbe d'étalonnage du TGP (Figure 20 ), on doit suivre les étapes représentée dans le tableau(09).

**Tab.09:** Etapes de la réalisation de la courbe d'étalonnage pour le TGP .

N° de tubes	1	2	3	4	5	6
Eau distillée (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Réactif 2 (ml)	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5
Réactif 4 (ml)	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Réactif 3 (ml)	1	1	1	1	1	1
Mélanger . Laisser 20 min ,à température ambiante.						
Sonde 0,4 N (ml)	10	10	10	10	10	10
Mélanger. Attendre 5 minutes. Photométrer.						
Unités TGP / ml	0	22	55	95	150	215

• **Etablissement de la courbe**

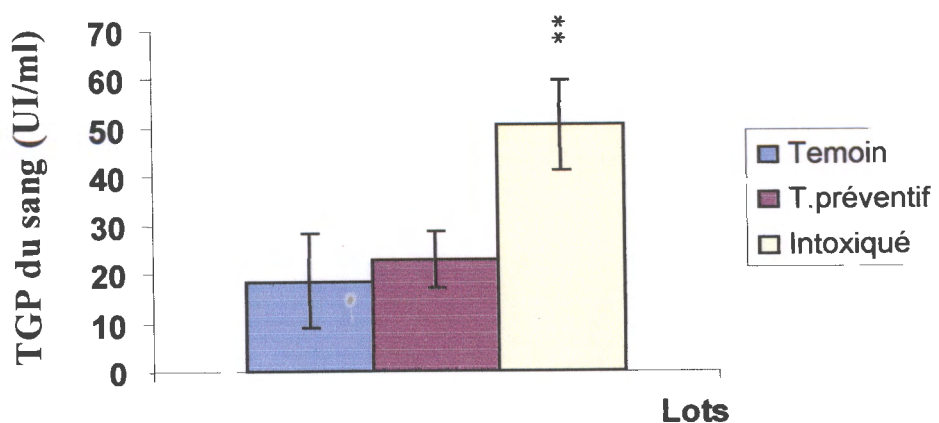


**Fig. 20:** Courbe d'étalonnage du TGP.

Les résultats du dosage du TGP sont illustrés dans le tableau (10) et représentés en histogrammes dans la figure (21).

**Tab.10** : Evaluation du taux du TGP en UI/ml dans le cas des différents traitements

Lots	Rats	Résultats	Moyen $\pm$ écart type
Témoin	1	17	18.5 $\pm$ 9.46
	2	32	
	3	15	
	4	10	
T.préventif Ex.BuOH+Epirubicine	1	30	22.75 $\pm$ 5.85
	2	25	
	3	18	
	4	18	
Inoxiqué (Epirubicine)	1	39	50.25 $\pm$ 9.42**
	2	49	
	3	51	
	4	62	



**Fig.21** : Evaluation du taux du TGP chez les différents lots. Les résultats sont présentés en Moyenne  $\pm$  Ecart type . \*\* p < 0.01 ,La différence est hautement significative.

Nous avons constaté chez le lot intoxiqué une augmentation hautement significative (p < 0.01) où la valeur de TGP atteint (50.25  $\pm$  9.42UI/ml) alors que la valeur des témoins est (18.5  $\pm$  9.46UI/ml).

Pour le lot traité préventivement qui atteint la valeur (22.75  $\pm$  5.85UI/ml), mais varie d'une manière non significative par rapport au lot témoin..

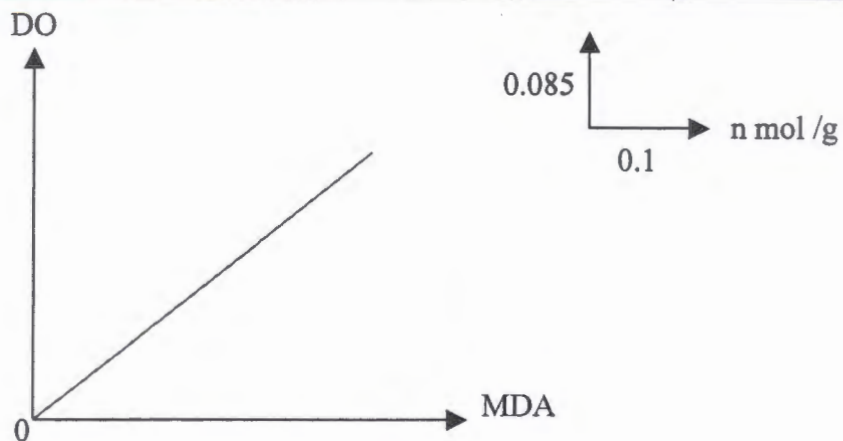


**V-1-3- Evaluation du MDA :**

• **Courbe d'étalonnage du MDA :**

Les mesures qui nous ont permis de dessiner la courbe d'étalonnage (Figure 22) sont les suivantes:

Concentration du MDA (nmol/g)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
DO	0,091	0,149	0,269	0,320	0,410	0,493	0,598

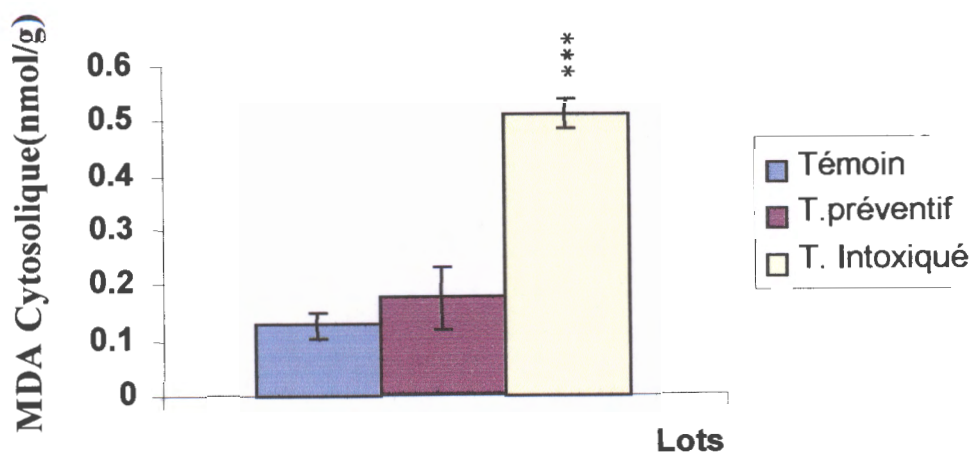


**Fig. 22 :** Courbe d'étalonnage du MDA.

Les résultats du dosage du MDA sont rassemblés dans le tableau(11) et représentés en histogrammes dans la figure( 23).

**Tab. 11 :** Evaluation du taux du MDA en n mol/ g de tissu hépatique dans le cas des différents traitements .

Lots	Rats	Résultats	Moyen ± écart type
Témoin	1	0.141	0.127 ± 0.024
	2	0.112	
	3	0.154	
	4	0.102	
T.préventif Ex BuOH+Epirubicine	1	0.202	0.176 ± 0.056
	2	0.244	
	3	0.121	
	4	0.140	
Intoxiqué (Epirubicine)	1	0.540	0.514 ± 0.026***
	2	0.531	
	3	0.482	
	4	0.503	



**Fig. 23:** Evaluation du taux MDA chez les différents lots. Les résultats sont présentés en Moyenne  $\pm$  Ecart type. \*\*\*  $p < 0.001$ , la différence est très hautement significative.

Chez le lot intoxiqué qui atteint la valeur ( $0.514 \pm 0.026$  n mol/g) ce qui montre une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) par rapport au lot témoin ( $0.127 \pm 0.024$  n mol/g), et une différence non significative entre le lot préventif et le lot témoin.

#### V-1-4-Résultats de dosage du catalase :

Les mesures qui nous ont permis de calculer les concentrations du catalase sont rassemblées dans le tableau (12).

**Tab.12 :** les étapes d'évaluation du taux de catalase.

Lots	Rats	A <sub>1</sub> (DO)	A <sub>2</sub> (DO)
Témion	1	0.299	0.293
	2	0.284	0.280
	3	0.294	0.291
	4	0.294	0.290
T.Préventif Ex BuOH+Epirubicine	1	0.186	0.185
	2	0.201	0.199
	3	0.181	0.179
	4	0.124	0.120
Intoxiqué (Epirubicine)	1	0.156	0.155
	2	0.151	0.150
	3	0.154	0.153
	4	0.110	0.109

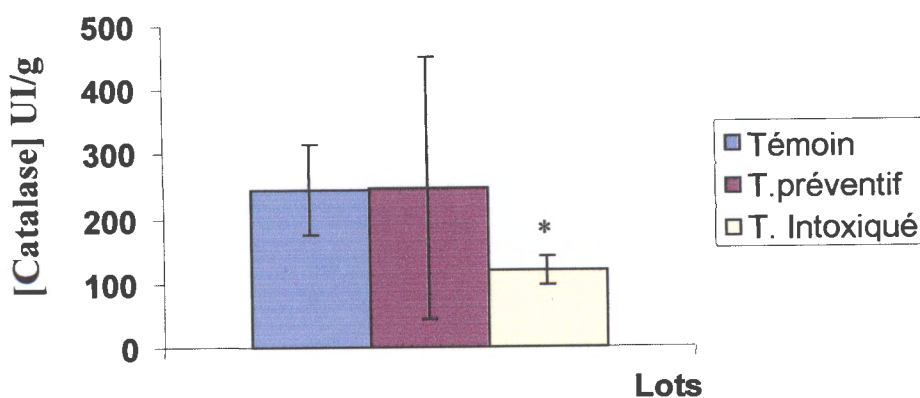
Le calcul de la concentration du catalase est réalisé par la formule suivante :

$$UI/g = 2.3033/T \times \log A_1/A_2/g \text{ de protéine.}$$

Les résultats du dosage du catalase sont rassemblés dans le tableau (13) et représentés en histogrammes dans la figure (24).

**Tab. 13 :** Evaluation du taux du catalase en UI/g de protéine dans le cas des différents traitements.

Lots	Rats	Résultats (UI/g) $\times 10^{-3}$	Moyen $\pm$ écart type ( $\times 10^{-3}$ )
Témoin	1	337	242.75 $\pm$ 69.37
	2	236	
	3	170	
	4	228	
T.Préventif Ex BuOH+Epirubicine	1	89	246.5 $\pm$ 203.93
	2	166	
	3	185	
	4	546	
Intoxiqué (Epirubicine)	1	107	119.25 $\pm$ 21.86 *
	2	110	
	3	108	
	4	152	



**Fig. 24 :** Evaluation du taux du catalase chez les différents lots. Les résultats sont représentés en Moyenne  $\pm$  Ecart type. \* $p < 0.05$ , la différence est significative par rapport aux témoins.

Nous avons observé chez le lot intoxiqué qui atteint la valeur((119.25  $\pm$  21.86UI/g) une différence significative ( $p < 0.05$ ) par rapport au lot témoin, mais varie de manière non significative entre le lot préventif qui atteint la valeur(246.5  $\pm$  203.93UI/g)et le lot témoin.

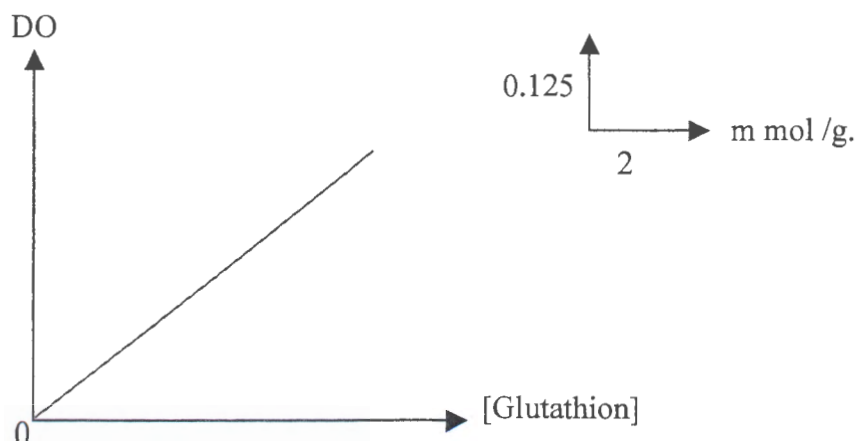
**V-1-5-Résultat de dosage du glutathion cytosolique du foie :**

● **Courbe d'étalonnage :**

Les mesures qui nous ont permis de dessiner la courbe d'étalonnage (figure 25) sont les suivantes :

[GSH] m mol/ml	40	20	10	5	2.5	1.25
DO	1.251	1.089	0.557	0.217	0.058	0.060

● **Etablissement de la courbe :**

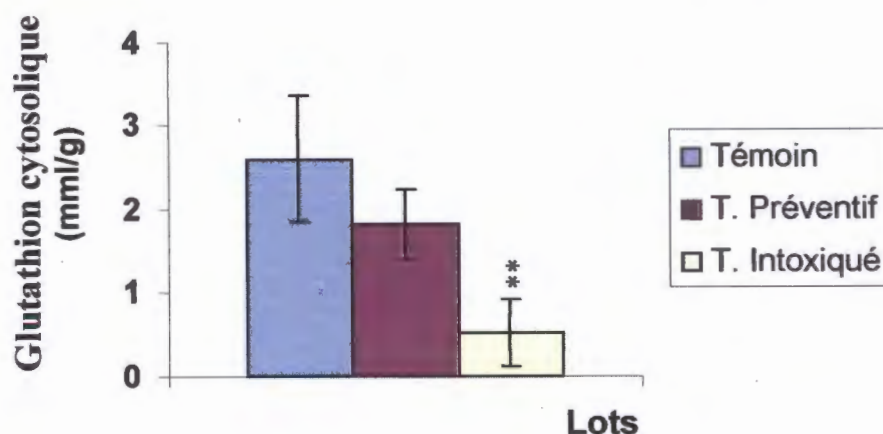


**Fig. 25 :** Courbe d'étalonnage du glutathion hépatique.

Les résultats de dosage du glutathion sont rassemblés dans le tableau (14) et représentés en histogramme dans la figure (26).

**Tab.14 :** Evaluation du taux du glutathion en mmol/g de tissu dans le cas de différents traitements.

Lots	Rats	Résultats	Moyen ± écart type.
Témoin	1	3.4	2.6 ± 0.76
	2	2	
	3	3.1	
	4	1.9	
T.Préventif ExBuOH+Epirubicine	1	1.8	1.8 ± 0.43
	2	1.4	
	3	1.6	
	4	2.4	
Intoxiqué (Epirubicine)	1	0.8	0.51 ± 0.39**
	2	0.2	
	3	0.9	
	4	0.14	



**Fig.26:** Evaluation de taux du glutathion chez les différents lots .Les résultats est présentés en Moyenne±Ecart type. \*\* $p < 0.01$ , la différence est hautement significative.

Nous avons constaté chez le lot intoxiqué qui atteint la valeur ( $0.51 \pm 0.39$ mmol/g) une **diminution** hautement significative par rapport au lot témoin qui atteint la valeur( $2.6 \pm 0.76$ mmol/g),et une différence non significative entre le lot préventif et le lot témoin.

#### V-1-6-Résultat de dosage du DPPH° :

L'évaluation *in vitro* de la densité optique **absorbée** par les molécules du radical libre, DPPH°, est résumée dans le tableau 15.

**Tab.15 :** Mesures des D.O de DPPH° en fonction du temps (de 30s-300s) *in vitro*, en présence de l'extrait butanolique de RRL.

Temps	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300
DO (control)	0.904	0.854	0.8410	0.823	0.810	0.800	0.788	0.780	0.777	0.774
DO (control+Ex-BuOH. 40 g/L)	0.244	0.226	0.223	0.221	0.220	0.219	0.219	0.218	0.218	0.218
DO(control+Ex-BuOH. 20 g/L)	0.743	0.480	0.363	0.297	0.264	0.245	0.236	0.228	0.212	0.209

#### Calcul du pourcentage de réduction de DPPH° :

Le calcul de réduction de la concentration de DPPH° après l'ajout de l'extrait butanolique à la dose de 40 g/L après 5 min est élaboré par la formule suivante:

$$\% \text{ de réduction} = [A_C - A_E/A_C] \times 100.$$

$$\% \text{ de réduction} = [0.77 - 0.218/0.774] \times 100 = 71.83\%.$$

$$\% \text{ de réduction} = 71.83\%.$$

Le calcul de réduction de la concentration de DPPH° après l'ajout de l'extrait butanolique à la dose de 20 g/L après 5 min :

$$\% \text{ de réduction} = [0.774 - 0.209/0.774] \times 100 = 72.99\%.$$

$$\% \text{ de réduction} = 72.99\%.$$

Chapitre VI

Discussion

## VI- Discussion

Notre organisme est exposé quotidiennement à plusieurs facteurs xénobiotiques parmi les quelles, la prise des médicaments aux effets secondaires très nocifs sur les différents organes dont nous citons les médicaments anticancéreux à grand pouvoir hépatotoxique. L'Epirubicine, est l'un des médicaments prescrits dans le cas de l'oncogénie ayant un pouvoir toxique redoutable sur l'organisme: altérant l'ADN, leucémies secondaires, inhibiteurs de topo-isomérase II.... (Vidal, 2002).

Le foie est une cible fréquente de plusieurs toxiques car il est l'organe épurateur de l'Epirubicine en l'éliminant par voie hépatobiliaire. Dans notre étude nous avons investi l'impact de la prise de ce médicament sur le niveau des radicaux libres oxygénés de l'hépatocyte chez les animaux de laboratoire ainsi le degré de prévention des polyphénols sur le stress oxydatif induit par ce médicament. En effet, ces atteintes hépatiques sont facilement reproductibles expérimentalement chez l'animal (Gray, 1976) par l'administration de l'Epirubicine chez les rats entraînant une génération des radicaux libres (Michel, 1992).

Par ailleurs, les polyphénols par leur capacité antioxydante ont le potentiel de réduire cette toxicité et pour quoi pas d'éliminer totalement grâce à leur structure qui leur permet de piéger les radicaux libres (Clerment, 2001).

Pour la mise en évidence des effets prooxydants d'une part et les effets hépatoprotecteurs des polyphénols d'autre part, nous avons soumis les rats à un traitement hépatotoxique et préventif à la fois par l'administration successive de l'Epirubicine à une dose de 75 mg/m<sup>2</sup> et des polyphénols extraits de RRL à une dose de 200mg/Kg.

Les indicateurs mesurés qui permettent de démontrer l'intoxication des lots traités par l'Epirubicine seul et de l'effet préventif des polyphénols sont : Les enzymes de transamination: Les TGO et TGP plasmatiques qui sont les plus communément utilisées, ils rendent compte de l'altération des endo-membranes ou de la nécrose cellulaire. La malonedialdéhyde de (MDA) renseigne sur l'intensité de la lipopéroxydation. La catalase et le glutathion sur le potentiel endogène antioxydant ou « protecteur » de la cellule (Ling et Gan, 1989 ; Sharma et al, 1989 ; Lexa et al, 1989).

- L'induction de l'hépatotoxicité par l'administration de l'Epirubicine, nous a permis d'observer une augmentation de TGO (69,5±10,55 UI/ml) et TGP (50,25±9,42 UI/ml) d'une manière hautement significative à P < 0.01 par rapport aux témoins TGO (37± 5.35 UI/ml) et TGP (18.5± 9.46 UI/ml). Ceci peut être expliqué par une destruction des hépatocytes en libérant ces deux enzymes dans le torrent circulatoire. On note aussi que l'élévation du taux de TGO est plus accentuée par rapport à celle constatée dans le cas de TGP. Ceci est dû à la distribution intracellulaire inéquivalente de TGO qui se trouve dans le

cytoplasme et la mitochondrie, alors que le TGP est une enzyme exclusivement cytoplasmique (Vanbourdal, 1996).

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus dans le model hépatotoxique réalisé par le  $CCl_4$  et le paracétamol qui, tous les deux, provoquent la destruction des biomembranes et la libération des transaminases dans le sang après une hépatonécrose. L'élévation du taux de TGO est un indicateur de toxicité du foie, néanmoins la TGP est la plus spécifique pour l'hépatotoxicité (Williansor et *al*, 1996). Dans d'autres travaux le taux moyen de TGP dans le cas des lots de rats intoxiqués par  $CCl_4$  à des doses identiques, varie de 150 à 7500 UI/l, les valeurs physiologiques étant voisines de 20 UI/l (Fleurentin, 1983, Lexa, 1988).

- L'évaluation du MDA nous a donné une concentration de  $(0,514 \pm 0,026 \text{ n mol/g})$  très hautement significativement élevée avec ( $P < 0.001$ ) par rapport à celle obtenue avec les témoins  $(0.127 \pm 0.024 \text{ nmol/g})$ . Elle pourrait être due à une peroxydation lipidique plus poussée après l'administration de L'Epirubicine, qui après sa métabolisation génère des radicaux libres (Michel, 1992). Ces derniers se lient à des acides gras polyinsaturés notamment au niveau des biomembranes, qui sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle (Esterbauer, 1999). Ce  $OH^\circ$  se transforme en peroxyde lipidique (Meagher et Fitz, 2000) puis libère les différents aldéhydes toxiques dont le malonedialdéhyde (Cadet et *al*, 2002).

Une augmentation significative du taux MDA dans le cas du model paracétamol ( $2,83 \text{ n mol/mg}$  de protéine,  $(p < 0,01)$ ) et celui de  $CCl_4$  ( $7,01 \text{ n mol/g}$  de g de protéine,  $p < 0.001$ ), a été observée dans d'autres travaux de recherches (Jallow, 1980), cette même augmentation a été confirmée à partir de test du tert-butyl hydroperoxyde sur le foie isolé (Rush et *al*, 1985 ; Rush et *al*, 1986 ; Tribble et *al*, 1988 ; Jewell et *al*, 1986), son action repose sur l'apparition de radicaux libres induisant une peroxydation lipidiques beaucoup plus intense que celle du  $CCl_4$  (Rush et *al*, 1986, Joyeux et *al*, 1990).

- En ce qui concerne la diminution significative ( $p < 0,05$ ) de la catalase cytosolique de l'hépatocyte dans le cas de notre model ( $119,25 \pm 21,86 \text{ UI/g}$  de protéine) par rapport à la valeur moyenne des témoins ( $242.75 \pm 69.37 \text{ UI/g}$ ) due à une production excessive des radicaux libres qui provoquent l'altération de l'activité biologique des macromolécules cellulaires, notamment les enzymes, dont la catalase, de par leur sensibilité au stress oxydant. En effet, la réduction de l'activité enzymatique peut résulter de nombreux effets dus à une accumulation des radicaux superoxydes et peroxydes d'hydrogène (Prakash et Khosa 1976; EL-Hossary, 2000).

Les travaux d'autres chercheurs ont montré la réduction de taux de catalase dans le cas du model paracétamol ( $312,65 \text{ UI/mg}$  de protéine) par rapport au groupe normal ( $364,87$



UI/mg) de protéine), par contre dans le cas du model  $\text{CCl}_4$  le taux de catalase est de (276,87 UI/mg de protéine) par rapport à celle de témoins (364,65 UI/mg de protéine,  $p < 0,001$ ) (Kirtikar et Basu, 1975; Prakash et Khosa, 1976).

- La réduction hautement significative ( $p < 0,01$ ) du taux de glutathion ( $0,51 \pm 0,39$  mmol/g de protéine) dans le cas du lot intoxiqué par rapport au témoin ( $2,6 \pm 0,76$  mmol/g) s'explique par le fait que lors d'un stress oxydant, le GSH est généralement consommé (Jones et al, 2002), la diminution du taux de glutathion est illustrée dans des études basées sur l'administration aux rats de paracétamol et  $\text{CCl}_4$ . Cette diminution est due à une production des radicaux libres, peroxyde et autres composés toxiques qui entraînent une réduction de taux de GSH, ceci est montré par des résultats obtenus à partir de l'évaluation du taux de GSH dans le cas de paracétamol ( $1,57 \mu\text{mol/g}$  du foie) par rapport au groupe normal ( $5,3 \mu\text{mol/g}$  de foie,  $p < 0,001$ ), alors que dans le cas de  $\text{CCl}_4$  ce taux est de ( $0,59 \mu\text{mol/g}$ ) par rapport au groupe normal ( $5,3 \mu\text{mol/g}$  de foie) (Jallow, 1980). Le même résultat est obtenu avec le tert-butyl hydroperoxyde qui entraîne lui aussi une déplétion marquée du glutathion (Rush et al, 1985; Jayeux, 1990).

- Les effets hépatoprotecteurs des polyphénols sont évalués dans le cas des rats traités préventivement puisque il y a une augmentation ou une diminution non significative pour tous les paramètres entre le lot préventif: TGO ( $38 \pm 4,08$  UI/ml), TGP ( $22,75 \pm 5,85$  UI/ml), MDA ( $0,176 \pm 0,056$  nmol/g), catalase ( $246,5 \pm 203,93$  UI/g), glutathion ( $1,8 \pm 0,43$  mmol/g) et le lot témoin: TGO ( $37 \pm 5,35$  UI/ml), TGP ( $18,5 \pm 9,46$  UI/ml), MDA ( $0,127 \pm 0,024$  nmol/g), catalase ( $242,75 \pm 69,37$  UI/g) et glutathion ( $2,6 \pm 0,76$  mmol/g). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Bors et al (1990) et Okuda et al (1983) sur l'activité antioxydante des polyphénols. Ces vertu antistress ont été confirmés également par le test à DPPH° *in vitro*.

- L'augmentation ou la diminution du taux de ces marqueurs de stress est régulée par des antioxydants endogènes et exogènes dont les polyphénols. Le potentiel "scavenger" de ces derniers est démontré par le test *in vitro* réalisé par la méthode du DPPH°, à partir du quelle nous avons constaté que les polyphénols sont des antioxydants (Piégeur des radicaux libres). En effet, une réduction dans la concentration de ce radical libre est évaluée à 71.83 et 72.99%, quand nous avons ajouté successivement les doses 40g/l et 20g/l des extraits polyphénoliques à la solution de DPPH°. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec d'autres méthodes telle que ORAC (oxygen radical absorbance capacity) dans le cas des polyphénols renfermés dans les végétaux et les fruits (Cuveher et al, 1992; Hogg et al, 1961).

D'une manière générale, le métabolite d'oxydoréduction de l'Epirubicine est le 13 hydroxy-dérivé ou épirubicinol (Vidal, 2000). Il comporte une fonction semi quinone et/ou

déglycosylée peut être génératrice des radicaux libres lors de sa métabolisation dans le foie (Michel, 1989), c'est pourquoi nous avons constaté une augmentation importante du stress oxydatif intracellulaire.

L'Epirubicine peut s'intercaler avec l'ADN. Des coupures simples et doubles brins peuvent survenir, passent probablement par l'intermédiaire de l'action de la topo-isomérase II (Tewey et al, 1984) ou par production des radicaux libres. Il réagit avec la cytochrome P 450 réductase en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) pour former un intermédiaire à radical semiquinone qui à son tour peut réagir avec un oxygène pour produire des anions superoxydes. Ces derniers peuvent produire les radicaux hydroxyles ( $^{\circ}\text{OH}$ ) et l'eau oxygénée (Myers, 1988), ce dernier, grâce à sa concentration élevée provoque une oxydation de la catalase et une oxydation de GSH en une glutathion oxydé (GSSH) et en conséquence la chute de leur concentration telle que nous l'avons constaté dans cette étude (Jones et al, 2002). Par ailleurs l'Epirubicine peut aussi interagir avec les membranes cellulaires (Tritton et al, 1978) essentiellement les phospholipides et provoque la peroxydation lipidique qui en résulte une augmentation de la concentration du produit final (MDA) et une perforation des membranes qui entraîne une libération des enzymes dont le TGO et TGP qui versent dans le torrent circulatoire avec des taux élevés justifiant les résultats de notre étude.

Chapitre VII

Conclusion

## VII- Conclusion :

Les plantes végétales présentent une réserve considérable de molécules à vertus thérapeutiques, susceptibles d'être une source continue d'approvisionnement de médicaments pour enrichir la pharmacopée actuelle.

L'étude biochimique et pharmacologique expérimentale sur l'activité antiradicalaire des extraits polyphénoliques dans le cas d'une hépatotoxicité à Epirubicine chez les animaux de laboratoire, a permis:

- De vérifier l'induction de l'hépatotoxicité par l'Epirubicine à partir des résultats obtenus après l'évaluation de certains paramètres tels que: la TGO, la TGP, le MDA, la catalase et le glutathion, marqueurs redoutables d'une hépatotoxicité, qui augmentent (TGO, TGP et MDA) ou diminuent (Catalase et glutathion) à cause de la production des radicaux libres oxygénés induite par l'Epirubicine.

- De constater l'effet préventif et scavanger des polyphénols se traduisant par l'évolution non significative de tous les indicateurs de stress étudiés, chez les rats intoxiqués et traités préventivement. Ceci a été consolidé par la mise en évidence *in vitro*, de l'effet piègeur des radicaux libres à savoir le DPPH° par les différentes concentrations de polyphénols.

A partir de cette étude, nous concluons donc, que les polyphénols sont des antioxydants et hépatoprotecteurs. Et pour mettre en évidence ces activités, nous recommandons une investigation plus poussée d'abord sur l'identification structurale des principes actifs de ces extraits antistress ainsi que sur les mécanismes biochimiques impliqués, permettant de réduire les ROS tant au niveau cytoplasmique qu'au niveau mitochondrial de l'hépatocyte.

# *Références*

## Références

- Agarwal, S.; See, J.J.; Hadley, M. 1994. Identification of a deoxyguanosine-malondialdehyde adduct in rat and human urine. *Prapper HH lipids*, 29 (6), p.429-432.
- Albano, E.; Lott, k .A .K.; Slater ,T .F.; Stier , A.; Symons, M.C. R.; tomasi, A.1982.Free radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria. *Biochem J.* 204, p. 593-603.
- Alex ,J.F. 2001. Ontario weeds – Description; Illustration and keys to their identification. Ontario ministry of agriculture, Food and rural affaires. Guelph-Ontario. Canada.
- Amillec, T. Et Gerard, D. 2003. Les plantes bioindicatrices. Edition promoteur, France. P.71.
- Bahorun ,T.; Trotine ,F.; Pommery, J.; Vsseur, J. And Pinkas, M. 1994. Antioxidant activities *Gataegus monogyna* extracts, *Planta Med.* 60, p.223-328.
- Bahorun ,T.; Gressier ,B.; Trotine ,F.; Brunet ,C.; Dine, T.; Luyckx, M.; Vasseur ,J.; Cazin M.; Cazin , J.C. And Pinkas, M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel forschung / Drug Research*, 46 II (1971). Assay of superoxide dismutase .*ANAL Biochem*,44,p.276-287.
- Beloued, A . 1998. Plantes médicinales d'Algérie. Alger ,p.3.
- Benhamou ,J.P. Et *al.* 2000. Maladies du foie et des voies biliaires, 4<sup>ème</sup> ed. Médecine- sciences. Flammarion. Paris, p . 6-17.
- Bensalem – Bendjelloul, M. 1994. La cellule et sa physiologie, office de publication Universitaire. Alger, p. 146–166.
- Borek, C.1997. Antioxidants and cancer – science et medicine, 52, p .60.
- Boveris, A. Et Chance, B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, p . 707–716.
- Bors ,W.; Heller,W.; Michel, C.; Satan, M.1990. Flavonoïds as antioxidants : determination of radical - scavenging – efficiencies. *Methods in enzymology*, 186,p. 343.
- Braun, H. P. M .; Emmerman ,V.; Kraft and U.K Schmitz.1992. The general mitochondrial processing peptidase from potato an integral part of cytochrome C reductase of respiratory chain embo J.
- Brown, H.S.; Bishop ,D.R. Et Rowan ,C.A . 1984. The role of skin absorption as a route of exposure for volatile organic compounds (VOCs) in drinking water. *Am. J. Public Health*, 74,p. 479.

- Brownlee ,H .E.; Hedger, J. And Scott ,I. M. 1992. Effects of a range of procyamidins on the cocoa pathogen *crinipallis perniciosa*. Phys. Mol. Plant Pathol, 40,p. 227 – 232.
- Bruneton, J.1993. Phormacognosie et phytochimie plantes médicinales. Paris.Ed. Lavoisier, p .1,2 , 66 , 350.
- Buettner ,G.R. Et Jurkiewicz, R.A.1996. Catalytic metal, ascorbate and free radicals : combinations to avoid. Radiat Res., 145,p. 532 – 541.
- Cadet ,J.; Bellon ,S.; Berger ,M.; Bourdat ,A.G.; Doukit .; Duarte, V.; Frelons ; Gasparutto, D.; Muller ,E. ; Ravanat, J. L. ; Sanvaigo ,S. 2002.Rrecent aspects of oxidative DNA damage : guanine lesions. measurement and susbstrate specificity of DNA repairglycosylases, Biol. Chem, 383 (6),p. 93.
- Cenac ,A.; Simonoff, M and Djibo, A. 1996. Nutritional status and plasma trace elements in peripartun cardiomyopathy. A comparative study in Niger. J Cardiovasc Risk,3 ,p.483-487
- Clairbone ,A.1985.Catalase activity .In.CRC handbook of methods for oxygen radical research.Ed Greenwald RA,CRC Press,Boca Raton,p.283-284.
- Clavel, J.P. And Thuillier ,A.1985. Lipid peroxydation et radicaux libres, rôle en biologie cellulaire et en pathologie. Path. Biol, 33 (1),p. 61– 69.
- Clermont ,F .2001 .*Ranunculus repens* L.in Europe Watsonia,11,p.353-366.
- Cooke ,M.S.; Evans, M.D.; Dizdaroglu ,M.; Lunec, J.2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease – FASEBJ, 17,p. 1195-1214.
- Curtin, J.F.; Donovan ,M.; Cotter ,T.G. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in appoptosis, J immunol. Methode, 265,p. 49-72.
- Cuvelier ,M.E.;Richard,H . Et Berset ,C.1992.*Biosci.Biotecxh.Biochem*,56,p.324-325.
- Dalton ,T. P.; Shertzter, H.G.; Ruga ,A. 2002. Regulation of gene expression by reactive oxygen, signaling,14,p.879.
- Davies , M.J .1987. Stable markers proteins damage and degradation by oxygen radicals: general aspects .JBC,262,p.9895-9901.
- Davies, M. J.1999. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. Free Rad Biol Med, 27,p.1151-1163.
- Davies ,M .J.2003. Singlet oxygen – mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys . Res . commun*, 305,p.761-770.
- Del Corso,L.; Pastine ,F.; Protti , M.A.; Romanelli , A.M.; Moruzzo, D.; Ruccoo, L.; Pentimone ,F.2000. Blood zinc, copper and magnesium in aging. A study in healthy home – living elderly. Panminerva Med, 42,p. 273-277.
- De oliveira ,M.M.; Sanpaio ,M.R.P.; Simon, F.; Gibert , B. And Mors ,W.B. 1972. Antitumor

- activity of condensed flavenols. *An – Acad. Brasil*, 44,p. 41-44.
- Deshpand ,S.; Deshpano, U.; Set Salune, D.K. 1996. Nutritional and health aspects of food antioxidants technological, Toxicological and health perspectives. *Food antioxidants*. Ed: Madhair et *al.* New York, p. 361-468.
- Dodet, B. 1991. La classe aux radicaux libres oxygénés. *J : Biofutur*, p. 23-34.
- Dubois ,G. E.; Grosby ,G. A.And Saffron ,P. 1977. Non nutritive sweeteners : taste structure relations hips with for some new simple dihydrochalcones.*Science*, 195, p. 397-399.
- Durand ,M.J.1989.Syntèse du glycogène et des proteins sur hépatocytes isolés de rat , intoxiqués au tert-butyl hydroperoxyde, DEA Toxicologie,Université de Metz (France).
- EL-Hossary,G.A .;Selim,M.A.; Sayed,A.E.;Khaleel,A.E.2000.Study of the flavonoid content of *Bassia muricata* and *Bauhinia racemasa*.*Bull Fac pharm Cairo Univ*,38,p.93-97.
- Ellman ,G.L.1959.Plasma antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys*,82,p.70-77.
- EL-Sohemy, A. ; Baylin ,A.; Spiegelmen ,D.; Ascherio, A.; Campos ,H.2002. Dietary and adipose tissue gamma – tocopherol and risk of myocardical infarction. *Epidemiology*, 13, p. 216-223.
- Esterbauer ,H.; Gebicki, J.; Puhl, H.; Jurgens ,G.1992. The role lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Rad. Biol-Med*,13, p.341.
- Esterbauer, H.1996. Estimation of peroxidative damage. A Critical Review symposium; conferences Lilly 1995. *Pathologie biologique*, 44 (1),p. 25-28.
- Etienne ,H. Meyer. 2004. Thèse : Etude de relation – structure, fonction de la proteine ORF 138, université Louis Pasteur, Strasbourg I.
- Favier ,A. 1998. Stress oxydante et mécanisme cellulaire. Effects deleteres des radicaux libres et défenses antioxydants. Deuxième colloque international. Elément trace, radicaux libres et pathologies oxydatives. Tunisie, 17-18 avril 1998.
- Favier, A. ; Cadat, J. ; Kalarynaman, R. ; Fentecave , M, Pierre J L. 1995. Analysis of free radicals in biological systems, Birkhauser. New York.
- Fleurentin , J.1983.Thèse Doctorat d’Etat és-Sciences pharmacocénitique ,université de Nancy (France),686 pp.Répertoire des pharmacopées traditionnelles du Yemen et étude pharmacologique de deux espèces à propriétés hépatorénales :*Copis rueppellii* et *Annisotes trislcus*.
- Gamther, H.E.1999. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reducdase, carcinogenesis, 20(9),p.1657.
- Gerard D et Camille T. 2003. Les plantes bioindicatrices guide de diagnostic des sols.*Edition promoteur*, p.200.



- Gey ,K.F.; Brubacher , G.B. And stahelin, H.G.1987. Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *An J clin Nutr*, 45, p.1368-1377.
- Gey ,K.F.; Moser, U.K.; Jordan ,P.; Stählin ,H.B.; Eichholzer M.; Ludin E.1993. Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential to carotene and vitamine C, *An J Clin Nutur*, 57, p.787-797.
- Girrotti ,A.W.1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effect or action in biological systems. *J. lipid research*,39,p.1529-1542.
- Glend, E.A.; Jr.; Hruszkuvycz, A. M. Et Recknagel, R. O. 1976. Critical role of lipid peroxidation in carbon tetrachloride – induced loss of aminopyrine demethylase, cytochrome P. 450 and glucose 6- phosphatas *Biochem. Pharmacol.*,25, p.2163.
- Goodenough.U.W.R. Et Levine P.P. 1970.Free radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondrial .*Sci.Am .*, 228,p .223 – 229.
- Gosselin ,R.E. ; Smith, R. P. Et Hodge, H.C.1984. *Clinical Toxicology of commercial products*. 5<sup>e</sup> edition. Williams and Wilkins. Baltimore MD.
- Gray ,J.E.1976. Assesment of hepatotoxic potential. *Environ. Heath persepect*, p.47 – 54.
- Gund.1986. *Plantes médicinales*. 6<sup>ème</sup> édition, p .6,29,30,31,32,33.
- Gutteridge ,J.M.C .Et Halliwelle, B. 1994. *Antioxidants in nutrition, health and disease*. Oxford university, press, Oxford.
- Hattori,I.; Nakamura ,H.; Masutai, H. Et *al.* 2003. Thioredoxin. Depend redox regulation – implication in aging and neurological disease. Critical review of axidative stress and aging – voll // RG culter and H Rodriguez Eds. Word scientific. P.87-101.
- Henderson, A.R .Et Moss, D.W. 2001. *Enzymes*. Tietz Fundamentals of chiminal chemistry, 5<sup>ème</sup> Ed. Burtis, C.A et Ashwood, ER. (W.B, Saundrs eds, philadelphia USA), p.352.
- Herber, V.; Shaw ,S.; Jayatilleke, E. 1996. Vitamine C – driven free radical generation from iron. *J. Nutr*, 126, p. 1213S-1220S.
- Hirsch ,E.C. 1993.Radicaux libres . *Eur. Neurol.* 33(Suppl 1),p .52-59.
- Hogg , J. S.;Lohmann , D.H. Et Russell ,K.E.1961. *Can .J.Chem*,39,p.1588-1594.
- Holgrem ,A. 2003. Redox regulation of genes and cell function. In: Critical review of oxidative stress and aging. Vol II R G culter and H Rodriguez Eds. World scientific,p.102-111.
- Holm ,L.; Doll ,J.; Holm ,E.; Pancho ,J.; Herberger. 1997. *World weeds – Natural Histories and distribution*. John Wiley and sons, Inc. Toronto. Canada.
- Jadot ,G. 1994. Antioxydants et vieillissement. *Jahn libbey eurotext*,p.34-52.
- Jallow , D.J.1980.Glutathione thresholds in reactive metabolite toxicity *Arch Toxicol Suppl*, 3,p.95-110.

- Jones , D.P.;Mody , V.C.;Carlson ,G.I. Et *al.*2002.Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defence. . Free Rad Biol Med,33,p.1290-1300.
- Joyeux ,M.;Rolland , A.; et *al.*1990.Tert-butyl hydroperoxide- induce injury in isolated rat hepatocyte :A model for studying antihépatotoxic crude drugs ,*Planta Med* , 56 ,p. 171-174 .
- Jewell ,S.A.; Di Monte, D. ; Rechelmi P Bellomo G. ;Orrenius S .1986.Tert –butyl hydroperoxide- induce toxicity in isolated epatocytes : Contribution of thiol oxidation and lipid peroxidation , *J.Biochem. toxicol* , 1, p. 13-22.
- Kalousova, M. ; Skrha, J. ; Zima ,T. 2002. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res.*,51, p.597-604.
- Kirtikar, K.R.; Basu, B.D.1975.Indian Medicinal Plants,vol 2, Dehradun , Indian. Bishen mahendra pal singh,p.842-844.
- Kisky ,N. 1989. Antioxidants function of carotenoides, Free Red. Biol. Med, 7,p. 617.
- Kreofsky ,T.; Schlager, J .W.; Vak-Pavlovic, Z.; Abraham, R.T. and Rohrbach ,M.S. 1992. Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophages. *Am. J. Resir, cell, Mol.Biol.*
- Levine ,S.A. And Kidd, P.M. 1996. Antioxidant adaptation, its role in free radical pathology, sauleandro, California, Ed SA. Research Group.
- Lexa, A. ;Fleurrentin, J. ; Lehr ,P.R. Et *al.* 1989. Choleric and hepatoprotectives properties of *eupotoroum cannabium* in the rat. *Planta Med*, 55,p.127-132.
- Ling ,N. Et Gank, H .1989. Antihepatotoxic principals of *solanum capsicastrum*. *Planta Med*, 55,p. 48-50.
- Mac Cay, P.B.; Lai, E.K.; Poyer, J.L. 1984. Oxygen and carbon centred free radical formation during carbon tetrachloride metabolism observation of lipid *in-vivo* and *in-vitro*. *J. Biol. Chem*, 259,p.2135-2143.
- Marcel ,G. et Valey, D.1992. Dictionnaire des termes techniques de médecine. Volume 1 de A à H, office des publication universitaire,p.1.
- Masquelier ,J .; Damon, M.C. and Dumas, J.1979. Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidolique. *Acta thérapeutique* ,1,p.101-104.
- Mc Collister D.D. ; Beamer ,W.H. ; Atchison, G. J. ; Spencer, H.C. 1951. The absorption, distribution and elimination of radioactive carbon tetrachloride by monkey upon exposure to low vapor concentration. *J. Pharmacol.Exp. Ther*, 102,p.112.
- Meagher, E.A. Et Fitzgerald, G.A. 2000. Indices of lipid peroxidation *in vivo*. Strengths and

- limitation. *Free Rad Med*, 28,p.1745-1750.
- Mezzetti ,A.; Pierdomenico ,S.D.; Costantini ,F. *Et al.* 1998. Copper / Zinc ratio and systemic oxidant load ; effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Rad Biol Med*, 25,p.676-681.
- Michel ,S. 1989. Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutique. Volume 2, Edition Stakine, Genève. P.825.
- Michel ,B .; Michel, L. ; Hervé, A .1993. Cours de pharmacologie 3ème Edition, Marketing, Paris,p . 339.
- Moran ,L.K. ; Gutteridge ,J.M. ; Quinlan, G.L.2001. Thiols in cellular redox signalling and control. *Curr Med Chem*,8,p. 763-772. Morely et Baroukir. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*. 342. Pt ,3,p. 481-496.
- Myers ,C.E.1988.Role of iron in anthracycline action . In ,Organ-Directed Toxicities of Anticancer Drugs.(Hacker M.P ; Lazo J.S. And Tritton T.R, eds.)Boston ,p.17-30.
- Néve ,J.; Vertangen ,F.; Peretz et Carpentier, Y.A .1989. Valeurs usuelles du selenium et de la glutation peroxydase dans une population belg. *Ann .Biol Clin* 47,p. 138-143.
- Novelli,G.P.1997. Role of free radicals in septic sock. *J physiol. Pharmacol*, 48,p.517-527.
- Ohkawa , H .;Ohishi , N. and Yagi , K.1979.Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction.*Analytical Biochemistry*,95,p.351-358.
- Okuda, T. ; Kimura ,Y. ; Yoshida ,T. ; Okuda,H and Arrichi ,S.1983. Studies on the activities of tanins and related compounds from medicinal plants and drugs.Inibitory effets of lipid peroxydation in mitochondria and microsome of liver. *Chem. Pharm. Bull*, 31,p. 1625-1631.
- Olanow, C.W. 1993. Radicaux libres . *Trends in Neuro. SC*, 16,p. 439-444
- Owuor ,E.D. Et Kong, A.N. 2002. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol*, 64,p. 765-770.
- Pantke ,U.; Volk ,T; Schmatzler, M .*Et al.*1999. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Rad Biol Med*, 27,p. 1080-1086.
- Paul, B.B. Et Rubinstein ,D.1963. Metabolism of carbon tetrachloride and chloroform by the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, p. 141.
- Picard ,D. 1996. The biochemistry of green tea polyphenols and their potential application in human skin cancer. *Alt Med Rev*, 1,p.31-42.
- Pierre ,L .2000. Le savoir des plantes, Ellipses édition. Marketing, Paris cedex 15,p. 44.
- Pincemail, J.; Meurisse, M. ; Limet ,R. Et Defraigne ,J.1999. Evaluation du stress oxydant : une réalité pour le médecin généraliste. *Vaisseaux, Cœur, Poumon*, 4,p. 148-154.
- Pincemail, J .; Siquet, J. ; Chappelle ,J.P. *Et al.*2000. Evaluation des concentrations

- plasmatiques en antioxydants anticorps contre les LDL oxydées et homocysteine dans un échantillon de la population liégeoise. *Ann Biol Chin*, 58,p.178-185.
- Plaa ,G.L .1980. Toxic responses of the liver. Dans : casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons 2ème edition. J. Doull, C.D. Klaassem et M.O Amdur (éditeur), Mac Millan,, New York, NY.
- Poyer, J.L. ; MC Cay, P.B. ; Jangen, E.G. Et Davis, E.R .1980. *Biochem, Biophys. Res. Commun*, 94,p.1154-1160.
- Prackash ,A. Et Khosa ,R.L.1976.Chimical studies on *Bauhini racemosa*.*Curr Sci*,45,p.705.
- Puchen ,S.; Coudray ,C.; Vanzetto ,G .And *al*. 1995. Time course of changer in plasma levels of trace elements after thrombolysis during the acute phase of myocardial infarction in human. *Biol. Trace. Element Res*, 47,p. 171-182.
- Recknagel ,R.O.; Glende, E.A.; Jr. Dolak ,J.A.; Waller. 1989. Mechanisms of carbon-tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther*, 43,p.139-154.
- Reilly ,M.; Delanty ,N.; Lawson ,J.A. And Fitz Gerald ,G.A .1996. Modulation of oxidative stress in vivo chronic cigarette smokers. *Circulation*, 94,p. 19-25.
- Reitman, S.;and Frankel, S.;AMER ,J.1957. *Clin.Path*,28,p.56.
- Rissanen ,T.;H; Votilainen,S .; Nyyssonen ,K.; Salonen R.; Kuplan ,G.A.; Salnen ,J.T.2003. Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis : the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study *Am J Clin Nutr* , 77,p.133-138.
- Rush, G.F.; Ripple, J.R.; Sowinski, J.; Bugelski ,P.; Hewitt ,W.R .1985.Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes,*Toxicol.Appl.Pharmacol*,78,p.473-483.
- Rush ,G.F.;Yodis ,L.A. ;Alberts, D.1986.Protection of rat hepatocytes from tert-butyl hydroperoxide-induced injury by catechol,*Toxiicol.Appl.Pharmacol*,84,p.607-616.
- Ryter ,S.F. And Tyrell ,R.M.2000. The heme synthesis and degradation pathways : role in oxidant sensitivity. Heme oxydgenase has hoth pro-and antioxidant properties. *Free Rad Biol Med*, 28,p. 289-309.
- Salonen ,J.T.2002. Clinical trials testing cardiovascular benefits of antioxidant supplementation. *Free Rad Res*, 36,p.1299- 1306.
- Salonen ,J.T.; Alfthan ,G.; Hutunen, J.K.; Pikkarainen ,J and Puskap.1982. Association between cardiovascular death and myocardial infraction and serum selenium in a matched – pair longitudinal study. *Lancet*, 24,p. 175-179.
- Sarukhan ,J.1976. On relative pressures and energy allocation in population of *ranunculus repens*, *R.bulbosus* and *R. acris*, *Ann. Missouri Bot. Garden*, 62,

**Présenté par:**

KROUN Siham  
LAKEHAL Houda  
BOULEGHALEGH Souaad

**Titre: Etude de l'effet antioxydant des polyphénols extraits de la plante *Ranunculus repens* L dans le cas d'une hépatotoxicité induite par l'Epirubicine chez les rats.**

Date de soutenance  
Juillet 2006

**Nature du diplôme :** Diplôme d'études supérieurs (D.E.S.)

### Résumé

Depuis longtemps, les plantes médicinales sont utilisées dans le traitement de plusieurs pathologies. Actuellement, il s'avère qu'elles renferment des principes actifs à grande vertu pharmacologique, parmi lesquels les polyphénols. En effet, l'étude biochimique et pharmacologique a permis la mise en évidence de l'effet antioxydant des polyphénols extraits de *Ranunculus repens* L dans une hépatotoxicité induite à l'Epirubicine. Puisque L'évolution de certains indicateurs (MDA, Catalase, GSH, DPPH°, TGO et TGP) du stress oxydatif induit par cet anticancéreux est prévenu par un traitement préventif par l'extrait butanolique des rats intoxiqués.

**Mots clés :** *Ranunculus repens* L, stress oxydant, polyphénols, traitement préventif, épirubicine, l'hépatotoxicité, l'extrait butanolique.

### ملخص

لقد استخدمت النباتات الطبية منذ القدم في علاج الكثير من الأمراض. في الوقت الحالي، اتضح أنها تحتوي على مواد فعالة من بينها البوليفينولات، في الواقع لقد سمحت لنا الدراسة البيوكيميائية و الصيدلانية بإيضاح التأثير المضاد للأكسدة للبوليفينولات المستخلصة من نبتة *Ranunculus Repens* L في حالة تسمم كبدي لفترة التجارب بواسطة L'épirubicine. لأن تطور بعض المؤشرات (MDA, GSH, DPPH°, TGO, TGP, و Catalase) المتعلقة بالتوتر الأوكسدي المستحدث بهذا الدواء يمنع بعلاج وقائي بواسطة مستخلص البيثانول.

### Summary

From a long time, the medicinal plants are used in the treatment of several pathology. Currently it turns out that to contain principles actives to great pharmacological virtue among witch the polyphenols. In effect, the study biochemistry and pharmacological witch enabled us the putting in evidence antioxidant activity of the polyphenols extracted from *Ranunculus repens* L in an hepatotoxicity induced by the Epirubicin. Because the evolution of certain indicators (MDA, Catalase, GSH, DPPH°, TGO and TGP) of the oxidant stress induced by this anticancer drug is prevented by preventive treatment using the buthanolic extract in the case of poisoned rats.