

Republique Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université de Jijel
Faculté des Sciences



Bc.09/08

Mémoire
De fin d'Etudes
En vue de l'obtention du
Diplôme Des Etudes Supérieures en
Biologie
Option : Biochimie

01
/



THEME

*Etude in vivo de l'effet préventif de l'Extrait
hydroalcoolique de Propolis sur la modulation du GSH
et de la Gamma Glutamyl-Transpeptidase au cours
d'un traitement par le Cyclophosphamide.*



Devant le jury :

- Examineur : M^{lle} ROUIBAH H.
- Encadreur : M^{lle} BENGVEDOUAR L.

Présenté par :

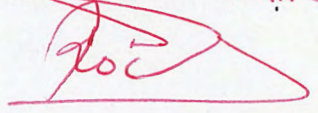
- Deghdough Souâd
- Dermouchi Wahiba
- Khelifa Hiba



Promotion 2008

BC.09/2008

Remerciements

ROUIBAH HASSI


Nous tenons aujourd'hui à remercier Dieu tout puissant de nous avoir aidé et éclairé le chemin pour la réalisation de ce modeste travail.

En particulier notre encadreur M^{lle} BENGUEDOUAR L. qui nous a proposé ce sujet de recherche et qui nous a encadrée et soutenu par ces conseils et ses efforts durant la préparation de notre mémoire.

Nous remercions M^{lle} ROUIBAH H. d'avoir accepté de juger le contenu du présent mémoire.

Nos vifs remerciements s'adressent également au Dr. LAHOUEL M. ainsi qu'au personnel du laboratoire du Département de Biologie (Mesdames Houria, Samira, Soumeya, Wided, Sonia et Mr Ziad) ainsi qu'au technicien du Laboratoire de Pharmacologie et phytochimie de l'Université de Jijel (Mr Yahia).

Nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail

Hiba, Souaâd et Wahiba.

SOMMAIRE

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

Partie bibliographique

Chapitre I: Le système de détoxification non –enzymatiques « Glutathion »..... 4

I-1- Définition de glutathion	4
I-2- Propriétés de glutathion	4
I-3- Biosynthèse de glutathion	5
I-4- Différentes formes de glutathion	5
I-5- Mécanisme d'action de glutathion	6
I-6- Rôle et important de glutathion	6
I-7- Relation entre GSH et les autres antioxydants.....	7
I-8- Autres antioxydants	7
I-8-1-Vitamine C	7
I-8-2-Vitamine E.....	7

Chapitre II: Le système de détoxification enzymatique..... 10

II-1- Glutathion s- transférase	10
II-1-1 Définition	10
II-1-2- localisation et les propriétés physicochimiques des GST	10
II-1-3-Rôle et mécanisme d'action des GST	11
II-2- La Glutathion peroxydase.....	12
II-2-1- Définition	12
II-2-2- Structure	13
II-2-4- Classification des Glutathion peroxydases.....	13
II-2-5- Mécanisme d'action des GPx	14
II-3- La Glutathion réductase.....	14
II-3-1-Définition	14
II-3-2- Rôle et mécanisme d'action de la Glutathion réductase	14
II-3-3- l'interdépendance enzymatique GPx-GR.....	15
II-4- La Gamma glutamyl- transpeptidase.....	15
II-4-1- Définition	15
II-4-2- Localisation de la GGT	15
II-4-3- Inducteurs de la GGT	15
II-4-4- L'activite sérique de la GGT	15
II-4-5- Rôle et mécanisme d'action de la GGT	16

Chapitre III : Les médicaments anticancéreux	19
III-1- Définition	19
III-2- Toxicité des médicaments anticancéreux	19
III-2-1- Toxicité aiguë	19
III-2-1- Toxicité chronique.....	19
III-3- Classification des médicaments anticancéreux.....	20
III-4- Mécanisme d'action des anticancéreux	21
III-4-1-Interaction directe avec l'ADN	
III-4-1-1-Alcoylation	21
III-4-1-2-Intercalation.....	21
III-4-1-3-cassures de l'ADN par la formation de radicaux libres	21
III-4-2-Interaction indirecte avec l'ADN	21
III-4-2-1- Anti-métabolites.....	21
III-4-2-2-Inhibition de la topoisomerase2	21
III-4-2-3Interaction avec les protéines cellulaires.....	22
III-5- Exemple sur les médicaments anticancéreux « cyclophosphamide »	22
III-5-1-Définition	23
III-5-2-La structure chimique développée	23
III-5-3-Posologie et la Mode d'Administration	23
III-5-4-Pharmacocinétique	23
III-5-5- Effets Secondaires.....	24

Chapitre IV : La Propolis : comme source de Flavonoïdes- 26

IV-1- Définition.....	26
IV-2- Caractères physico-chimiques	26
IV-3- Composition chimique de la Propolis.....	27
IV-4- Composés chimiques présents dans les différentes propolis.....	28
IV-5- Activité biologiques de la Propolis.....	29

Partie pratique

I: Matériel et Méthodes.....	32
I-1-Matériel.....	32
I-1-1- Matériel Biologique et chimique.....	32
I-1-1-1-Entretien des animaux.....	32
I-1-1-2-Préparation de l'extrait hydroalcoolique	
I-1-1-3- Médicament cyclophosphamide	32
I-1-1-4-Traitement des animaux.....	32
I-1-2- Matériel de laboratoire	33
I-2-Méthodes	33
I-2-1- Sacrifice et dissection des animaux	33
I-2-2- Exploration biochimique.....	33
I-2-3- Dosage et mesures des activités enzymatiques	34
I-2-3-1- Dosage du glutathion cytosolique.....	34
I-2-3-2- Dosage des protéines cytosolique.....	35
I-2-3-3- Activité de gamma glutamyl transpeptidase.....	35

II- Résultats et Interprétation	38
II-1- Variations des poids des animaux	38
II-2- Rapport des poids des organes /poids des animaux	39
II-2-1- Rapport des poids des foies /poids des animaux	39
II-2-2- Rapport des poids des reins /poids des animaux	40
II-3- Dosage du glutathion cytosolique	40
II-3-1- Courbe d'étalonnage du GSH	40
II-3-2- Dosage du glutathion	41
II-3-2-1- Dosage du glutathion à partir de la fraction cytosolique hépatique.....	42
II-3-2-1- Dosage du glutathion à partir de la fraction cytosolique rénale	42
II-4- Mesure de l'activité enzymatique de la Gamma-Glutamyl Transpeptidase.....	43
II-4-1- Activité enzymatique de la γ -GT cytosolique du foie.....	43
II-4-2- Activité enzymatique de la γ -GT urinaire.....	44
III- Discussion	41
Conclusion	43

Liste des figures

Figure 01: Formule développée du glutathion.....	4
Figure 02: Modèle tridimensionnel du glutathion	4
Figure 03: Les deux forme de glutathion.....	5
Figure 04: Mécanisme du piégeage des radicaux libres par la vitamineE.....	8
Figure 05: Conjugaison des époxydes et des halogénéation catalysée par la glutathion (GSH) transférase.....	10
Figure 06: La structure de la sélénocysteine	13
Figure 07: Restitution du GSH par la GSH réductase	15
Figure 08: Cycle Gamma Glutamyle	17
Figure 09: Sites d'action des principaux médicaments anticancéreux	22
Figure 10: La structure chimique de cyclophosphamide.....	23
Figure 11: Activation métabolique du cyclophosphamide	24
Figure 12: La libération de TNB à partir de DTNB par la molécule de GSH.....	34
Figure 13: Variations des poids corporels des animaux	38
Figure 14: Rapports des poids des foies et les poids corporels pour chaque lot au cours de l'étude.....	39
Figure 15: Rapports des poids des reins et les poids corporels pour chaque lot au cours del'étude	40
Figure 17: Courbe d'étalonnage du GSH.....	41
Figure 18: Variations des taux de GSH hépatique entre les lots 1, 2 et 3 au cours de l'étude.....	41
Figure 19: Variations des taux de GSH rénal entre les lots 1, 2 et 3 au cours de L'étude	42
Figure 20: Les variations de l'activité enzymatique de la γ -GT chez les animaux témoin Et traité.....	43
Figure 21 : Variations de l'activité enzymatique de la γ -GT chez les animaux de chaque lot avant et après le traitement	44

Liste des tableaux

- Tableau 1** : Les propriétés physico-chimiques du Glutathion.
- Tableau 2** : Mécanismes protecteurs non enzymatiques contre les Espèces oxygénées réactives et les radicaux libres
- Tableau 3** : Nomenclature, localisation chromosomique et caractéristiques physico-chimiques des GST humaines les plus étudiées
- Tableau 4** : Localisation tissulaire des GST les plus étudiées
- Tableau 5** : Classification des Médicaments Anticancéreux
- Tableau 6** : Composition chimiques de la propolis dans différentes régions. **Tableau 7** : Principales activités biologiques de la propolis
- Tableau 8** : Préparation de la solution 1 de mesure
- Tableau 9** : Dosage du glutathion
- Tableau 10** : Composition du mélange réactionnel.
- Tableau 11** : Dosage des protéines cytosoliques
- Tableau 12** : Activité de γ -GT
- Tableau 13** : Poids des souris des trois lots chaque semaine (g)
- Tableau 14** : Rapport des poids des foies / poids des animaux
- Tableau 15** : Rapport des poids des reins / poids des animaux.
- Tableau 16** : Résultats des DO de la courbe d'étalonnage de GSH.
- Tableau 17** : Résultats du dosage du glutathion hépatique (mM/ 1g de tissu)
- Tableau 18** : Résultats du dosage du glutathion rénal (mM/1g de tissu)
- Tableau 19** : Résultats de l'activité de la γ -GT cytosolique hépatique (UI/mg de Protéine)
- Tableau 13** : Résultats de l'activité de la γ -GT urinaire (UI)

Liste des abréviations

O_2^- : Anion superoxyde
 H_2O_2 : L'eau oxygène. (Peroxyde d'hydrogène)
 HO_2^- : Perhydroxyle
 H^+ : Peroxyde d'azote
 $ONOO^-$: Peroxynitrite
 $\cdot OH$: Radical hydroxyl
 OH^- : Ion hydroxyl
 $RO\cdot$: Radical peroxyde
 $RO_2\cdot$: Radical peroxyde
 $ClOH$: Acide hypochloreux
 1O_2 : Oxygène singulet
ROS: Réactif oxygen species
ADN: Acid désoxyribonucléique
NAD: Adénine di nucléotide nicotinamide
NADH : Nicotinamide adénine di nucléotide réduit
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
GSH: Glutathion réduit
G-S-S-G: Glutathion oxydé
RE: Réticulum endoplasmique
GST: Glutathion S- transférase
E.coli: Echerichia -Coli
Se: Sélénium
GPx: Glutathion peroxydase
MM: Milimole
eGPx: Glutathion peroxydase extracellulaire.
GGT: Gamma -glutamyl Tran peptidase
UI/L: Unite international par litre
RL: Radical libre.
ELF : Epithéliale Ling fluid
TCA:Trichloracétique
Trs/min: Tour par minute
DTNB: Acide 5',5 dithiodis 2 Nitrobenzoïque
TNB: Thio nitro benzoïque
TS: Tampon tris-sucrose
DO: Densité optique

SOMMAIRE

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

Partie bibliographique

Chapitre I: Le système de détoxification non –enzymatiques « Glutathion ».....	4
I-1- Définition de glutathion	4
I-2- Propriétés de glutathion	4
I-3- Biosynthèse de glutathion	5
I-4- Différentes formes de glutathion	5
I-5- Mécanisme d'action de glutathion	6
I-6- Rôle et important de glutathion	6
I-7- Relation entre GSH et les autres antioxydants.....	7
I-8- Autres antioxydants	7
I-8-1-Vitamine C	7
I-8-2-Vitamine E	7
Chapitre II: Le système de détoxification enzymatique.....	10
II-1- Glutathion s- transférase	10
II-1-1 Définition	10
II-1-2- localisation et les propriétés physicochimiques des GST	10
II-1-3-Rôle et mécanisme d'action des GST	11
II-2- La Glutathion peroxydase.....	12
II-2-1- Définition	12
II-2-2- Structure	13
II-2-4- Classification des Glutathion peroxydases.....	13
II-2-5- Mécanisme d'action des GPx	14
II-3- La Glutathion réductase.....	14
II-3-1-Définition	14
II-3-2- Rôle et mécanisme d'action de la Glutathion réductase	14
II-3-3- l'interdépendance enzymatique GPx-GR.....	15
II-4- La Gamma glutamyl- transpeptidase.....	15
II-4-1- Définition	15
II-4-2- Localisation de la GGT	15
II-4-3- Inducteurs de la GGT	15
II-4-4- L'activite sérique de la GGT	15
II-4-5- Rôle et mécanisme d'action de la GGT	16

Chapitre III : Les médicaments anticancéreux	19
III-1- Définition	19
III-2- Toxicité des médicaments anticancéreux	19
III-2-1- Toxicité aiguë	19
III-2-1- Toxicité chronique	19
III-3- Classification des médicaments anticancéreux	20
III-4- Mécanisme d'action des anticancéreux	21
III-4-1-Interaction directe avec l'ADN	
III-4-1-1-Alcoylation	21
III-4-1-2-Intercalation	21
III-4-1-3-cassures de l'ADN par la formation de radicaux libres	21
III-4-2-Interaction indirecte avec l'ADN	21
III-4-2-1- Anti-métabolites	21
III-4-2-2-Inhibition de la topoisomerase2	21
III-4-2-3Interaction avec les protéines cellulaires	22
III-5- Exemple sur les médicaments anticancéreux « cyclophosphamide »	22
III-5-1-Définition	23
III-5-2-La structure chimique développée	23
III-5-3-Posologie et la Mode d'Administration	23
III-5-4-Pharmacocinétique	23
III-5-5- Effets Secondaires	24

Chapitre IV : La Propolis : comme source de Flavonoïdes- 26

IV-1- Définition	26
IV-2- Caractères physico-chimiques	26
IV-3- Composition chimique de la Propolis	27
IV-4- Composés chimiques présents dans les différentes propolis	28
IV-5- Activité biologiques de la Propolis	29

Partie pratique

I: Matériel et Méthodes.....	32
I-1-Matériel	32
I-1-1- Matériel Biologique et chimique	32
I-1-1-1-Entretien des animaux	32
I-1-1-2-Préparation de l'extrait hydroalcoolique	
I-1-1-3- Médicament cyclophosphamide	32
I-1-1-4-Traitement des animaux	32
I-1-2- Matériel de laboratoire	33
I-2-Méthodes	33
I-2-1- Sacrifice et dissection des animaux	33
I-2-2- Exploration biochimique	33
I-2-3- Dosage et mesures des activités enzymatiques	34
I-2-3-1- Dosage du glutathion cytosolique	34
I-2-3-2- Dosage des protéines cytosolique	35
I-2-3-3- Activité de gamma glutamyl transpeptidase	35

II- Résultats et Interprétation	38
II-1- Variations des poids des animaux.....	38
II-2- Rapport des poids des organes /poids des animaux	39
II-2-1- Rapport des poids des foies /poids des animaux	39
II-2-2- Rapport des poids des reins /poids des animaux	40
II-3- Dosage du glutathion cytosolique	40
II-3-1- Courbe d'étalonnage du GSH.....	40
II-3-2- Dosage du glutathion	41
II-3-2-1- Dosage du glutathion à partir de la fraction cytosolique hépatique.....	42
II-3-2-1- Dosage du glutathion à partir de la fraction cytosolique rénale	42
II-4- Mesure de l'activité enzymatique de la Gamma-Glutamyl Transpeptidase.....	43
II-4-1- Activité enzymatique de la γ -GT cytosolique du foie.....	43
II-4-2- Activité enzymatique de la γ -GT urinaire.....	44
III- Discussion	41
Conclusion	43

Liste des figures

Figure 01: Formule développée du glutathion.....	4
Figure 02: Modèle tridimensionnel du glutathion	4
Figure 03: Les deux forme de glutathion.....	5
Figure 04: Mécanisme du piégeage des radicaux libres par la vitamineE.....	8
Figure 05: Conjugaison des époxydes et des halogénéation catalysée par la glutathion (GSH) transférase.....	10
Figure 06: La structure de la sélénocysteine	13
Figure 07: Restitution du GSH par la GSH réductase	15
Figure 08: Cycle Gamma Glutamyle.....	17
Figure 09: Sites d'action des principaux médicaments anticancéreux	22
Figure 10: La structure chimique de cyclophosphamide.....	23
Figure 11: Activation métabolique du cyclophosphamide.....	24
Figure 12: La libération de TNB à partir de DTNB par la molécule de GSH.....	34
Figure 13: Variations des poids corporels des animaux	38
Figure 14: Rapports des poids des foies et les poids corporels pour chaque lot au cours de l'étude.....	39
Figure 15: Rapports des poids des reins et les poids corporels pour chaque lot au cours del'étude	40
Figure 17: Courbe d'étalonnage du GSH.....	41
Figure 18: Variations des taux de GSH hépatique entre les lots 1, 2 et 3 au cours de l'étude.....	41
Figure 19: Variations des taux de GSH rénal entre les lots 1, 2 et 3 au cours de L'étude	42
Figure 20: Les variations de l'activité enzymatique de la γ -GT chez les animaux témoin Et traité.....	43
Figure 21 : Variations de l'activité enzymatique de la γ -GT chez les animaux de chaque lot avant et après le traitement	44

Liste des tableaux

- Tableau 1 :** Les propriétés physico-chimiques du Glutathion.
- Tableau 2:** Mécanismes protecteurs non enzymatiques contre les Espèces oxygénées réactives et les radicaux libres
- Tableau 3:** Nomenclature, localisation chromosomique et caractéristiques physico-chimiques des GST humaines les plus étudiées
- Tableau 4 :** Localisation tissulaire des GST les plus étudiées
- Tableau 5 :** Classification des Médicaments Anticancéreux
- Tableau 6 :** Composition chimiques de la propolis dans différentes régions. **Tableau 7 :** Principales activités biologiques de la propolis
- Tableau 8:** Préparation de la solution 1 de mesure
- Tableau 9 :** Dosage du glutathion
- Tableau 10:** Composition du mélange réactionnel.
- Tableau 11:** Dosage des protéines cytosoliques
- Tableau 12:** Activité de γ -GT
- Tableau 13 :** Poids des souris des trois lots chaque semaine (g)
- Tableau 14:** Rapport des poids des foies / poids des animaux
- Tableau 15 :** Rapport des poids des reins / poids des animaux.
- Tableau 16:** Résultats des DO de la courbe d'étalonnage de GSH.
- Tableau 17 :** Résultats du dosage du glutathion hépatique (mM/ 1g de tissu)
- Tableau 18:** Résultats du dosage du glutathion rénal (mM/1g de tissu)
- Tableau 19 :** Résultats de l'activité de la γ -GT cytosolique hépatique (UI/mg de Protéine)
- Tableau 13:** Résultats de l'activité de la γ -GT urinaire (UI)

Liste des abréviations

O_2^- : Anion superoxyde
 H_2O_2 : L'eau oxygène. (Peroxyde d'hydrogène)
 HO_2^- : Perhydroxyle
 H^+ : Peroxyde d'azote
 $ONOO^-$: Peroxynitrite
 $\cdot OH$: Radical hydroxyl
 OH^- : Ion hydroxyl
 $RO\cdot$: Radical peroxyde
 $RO_2\cdot$: Radical peroxyde
 $ClOH$: Acide hypochloreux
 1O_2 : Oxygène singulet
ROS: Réactif oxygen species
ADN: Acid désoxyribonucléique
NAD: Adénine di nucleotide nicotinamide
NADH : Nicotinamide adénine di nucléotide réduit
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
GSH: Glutathion réduit
G-S-S-G: Glutathion oxydé
RE: Réticulum endoplasmique
GST: Glutathion S- transférase
E.coli: Echerichia -Coli
Se: Sélénium
GPx: Glutathion peroxydase
MM: Milimole
eGPx: Glutathion peroxydase extracellulaire.
GGT: Gamma -glutamyl Tran peptidase
UI/L: Unite international par litre
RL: Radical libre.
ELF : Epithéliale Ling fluid
TCA:Trichloracétique
Trs/min: Tour par minute
DTNB: Acide 5',5 dithiodis 2 Nitrobenzoïque
TNB: Thio nitro benzoïque
TS: Tampon tris-sucrose
DO: Densité optique

Introduction

Introduction

Le cancer est un ensemble de maladies caractérisé par un dérèglement des mécanismes de contrôle qui gouvernent la prolifération et la différenciation cellulaire (Berman, 1999), affectant l'homme de tout âge, de toutes races, ainsi que les espèces animales, quelle qu'en soit les facteurs favorisant le développement d'un cancer tels que les facteurs biologiques (hérédité, virus, déficiences du système immunitaire...etc), les facteurs physiques (rayonnement ionisants) et les facteurs chimiques (agents cancérigènes, médicaments) (Tamborini, 1997).

Les traitements traditionnels du cancer incluent la chirurgie (CHX), la radio-thérapie (RT) et la chimiothérapie (CT). Les deux premières ont une action purement locale, tandis que la troisième a une action systématique (Devuler, 1998). Les médicaments anticancéreux utilisés dans la chimiothérapie n'agissent malheureusement pas uniquement sur les cellules tumorales. Ils sont également toxiques pour les cellules normales à renouvellement rapide et pour certains organes (Morin et al., 2002).

Le foie et le rein représentent les organes les plus sensibles aux traitements par ce type de xénobiotiques qui au cours de leur biotransformation et excrétion, provoquent des altérations et dysfonctionnements hépatiques et rénaux. Ces effets délétères résultent des métabolites réactifs ainsi que des radicaux libres issus des réactions de phase I par le système P-450 et II de conjugaison, localisées au niveau du foie et partiellement rénale. Cependant, il existe un système de défense permettant de neutraliser les substances toxiques (métabolites, Radicaux Libres) par différents mécanismes de détoxification enzymatique et non enzymatique.

D'autre part, certaines substances naturelles sont pourvues d'activités préventives et antioxydantes permettant de contrecarrer les effets pro-oxydants néfastes des médicaments après leur métabolisme. Les flavonoïdes constituent les composés les plus répondus dotés de ce type d'activités (Lahouel et al., 2004 ; Benguedouar et al., 2008).

La présente investigation vise à évaluer le système de défense représenté par des marqueurs biologiques intervenant dans la détoxification hépatique et rénales tel que le glutathion ainsi qu'une enzyme, exprimant les dommages tissulaires au niveau des deux organes (foie et rein), symbolisé par la gamma-glutamyle transpeptidase au cours d'un traitement par un médicament anticancéreux : le Cyclophosphamide (Famisas ®) seul et en association avec un extrait hydro-éthanolique de la Propolis. L'étude a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie de la faculté des sciences de l'université de Jijel sur des souris Albinos NMRI.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- *LE SYSTEME DE DETOXIFICATION NON ENZYMATIQUE*
- *LE SYSTEME DE DETOXIFICATION ENZYMATIQUE GLUTATHION DEPENDANT*
- *LES MEDICAMENTS ANTI CANCEREUX*
- *LA PROPOLIS: SOURCE DE FLAVONOÏDE*

Chapitre I

Le système de Détoxyfication non Enzymatique

I- Le Système de détoxification non enzymatique « Glutathion »

I-1-Définition du Glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide produit naturellement dans les cellules de l'organisme, Il constitue le principal thiol non-protéique dans les cellules des mammifères. Il agit comme un régulateur majeur dans le système redox de la cellule (Slater, 1972). Le glutathion permet le maintien des thiols de protéines et formes réduites des autres antioxydants tels que l' α - tocophérol et l'acide ascorbique, il apporte une protection aux cellules contre les effets délétères oxydatifs ou les autres types de toxicités (Benzi et al., 1988). Le glutathion formé par la condensation d'acide glutamique de la cystéine et de la glycine (γ -L-glutamyle-L-cysteinyl glycine). A noter que le groupement amine de la cystéine se condense avec la fonction acide carboxylique en γ de l'acide glutamique (figure 1 et 2). Il est présent dans les fruits et les légumes, les invertébrés et les vertébrés au niveau intra-cellulaire dans la plupart des organes (foie, reins, cerveau ...) (Aslund et al., 1997).

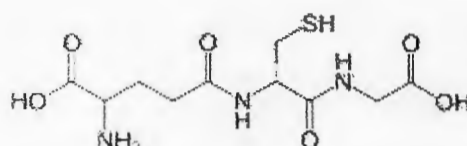


Figure 1 : Formule développée du glutathion (Aslund et al., 1997).

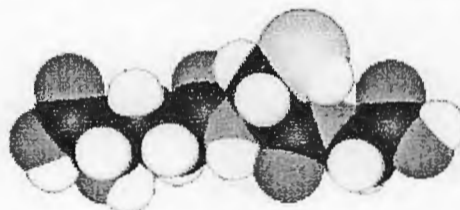


Figure 2 : Modèle tridimensionnel du glutathion (Aslund et al., 1997).

I-2- Les Propriétés de GSH

Le glutathion est le principal agent du bon fonctionnement de l'organisme, il stimule le système immunitaire et de détoxification (Aslund et al., 1997). Le tableau (1) indique les propriétés physico-chimiques du glutathion.

Tableau 1 : Les propriétés physico-chimiques du Glutathion.
(Aslund et al., 1997).

Formule chimique	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$ (figure 3et4)
Nom (IUPAC)	Acide 2-amino-5-[[2-[(carboxyméthyl)amino]-1-(mercaptométhyl)-2-oxoéthyl]amino]-5-oxopentanoïque
Apparence	Cristaux blancs
Masse molaire	307.3 g/mol
Température de fusion	458-468 K (856-195 C°)
Potentielle redox standard	$E^{\circ}_{(GSSG/GSH)} = 0.24V^{III}$

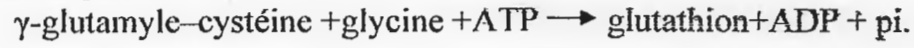
I-3 – La Biosynthèse du glutathion

La synthèse de glutathion s'effectue en deux étapes :

Au cours de la première étape, l'acide glutamique et la cystéine se condensent pour donner la γ -glutamyle-cystéine. Cette première étape est catalysée par γ -glutamyl cystéines synthétase.



Au cours de la deuxième étape le dipeptide réagit avec la glycine pour former la γ -glutamyle-cysteinyl-glycine. Cette seconde étape est catalysée par la glutathion synthétase (Weil, 2005).

**I-4- Les Différentes Formes de Glutathion**

Le glutathion passe d'une forme réduite GSH à une forme oxydée GSSG (Lodish et al., 1997). Le pont dissulfure créé par l'oxydation de deux molécules de glutathion à l'état réduit (GSH) se déperissent en une molécule de glutathion à l'état oxydé (GSSG) (Moussard, 2006). Le groupe SH d'un résidu cystéine réagit d'abord avec l'un des deux atomes de soufre de la liaison dissulfure GSSG et une molécule de glutathion réduit GSH (Lodish et al., 1995) (figure 3). Le rapport entre le GSH et le GSSG est supérieur à 500 dans la cellules (Stryer et al., 2003).

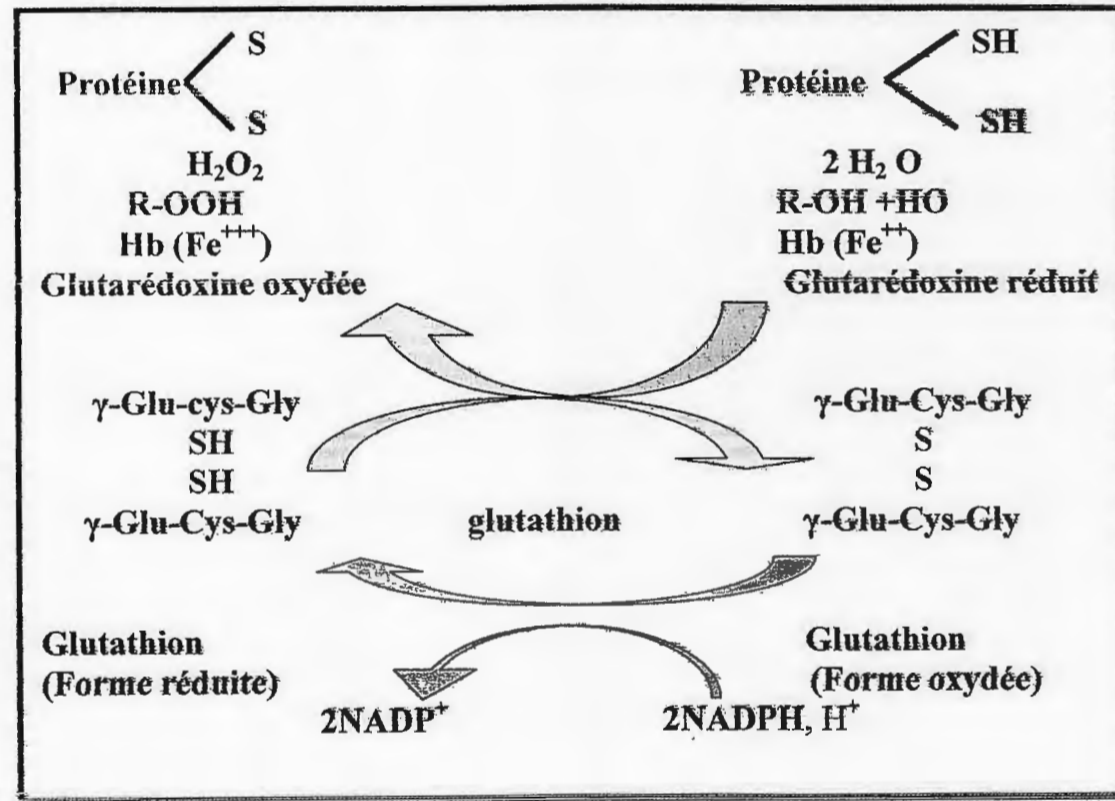


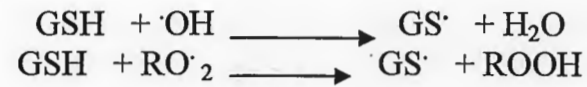
Figure 3 : Les deux formes de GSH (Moussard, 2006).

I-5-Mécanisme d'action du Glutathion

Un antioxydant est une molécule qui piège les radicaux libres; encore faut-il que ce «éboueur» soit régénéré *in vivo* et que les nouveaux radicaux formés ne soient pas délétères (Moussard, 2006). Le glutathion joue un rôle important dans la désactivation des radicaux libres. Il peut aussi réagir sans l'intervention d'une enzyme avec des radicaux comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le radical peroxyde ($RO\cdot$) et le radical peroxy ($ROO\cdot$) en générant du GSSG (Reichl et al., 2004).



Le glutathion réduit (GSH) est un antioxydant vis-à-vis des radicaux: OH et RO_2 et du radical $R\cdot$.



Cependant le radical thiyle $GS\cdot$ formé n'est pas inoffensif car il peut générer de nouveaux radicaux libres qui peuvent à leur tour provoquer des dommages moléculaires (Moussard, 2006).

I-6- Rôle et Importance du Glutathion

« Vous devez augmenter vos niveaux de GSH si vous voulez conserver votre jeunesse et vivre longtemps. De hauts niveaux de GSH sont associés à la santé et à la longévité. De bas niveaux laissent prévoir la maladie est une mort précoce » Jeancarper, Stopagungnow (Gutman & Shettini, 1993).

Chaque cellule de l'organisme possède son propre réseau de défense silencieux contre les pathologies, les dommages causés par l'environnement et le vieillissement. Heureusement, les cellules sont munies d'antioxydants, des agents qui neutralisent les radicaux libres en leur donnant un électron (Gutman & Shettini, 1993).

Le Glutathion est une molécule multi-fonctionnelle notamment dans la défense contre les ROS. Il agit comme agent non enzymatique avec une série de RL incluant le radical hydroxyle ($OH\cdot$) l'acide hypochloreux ($HOCl$), le radical alkoxy ($RO\cdot$), les peroxy radicaux ($ROO\cdot$), l'oxygène singulet (1O_2), ainsi que beaucoup d'autres radicaux à nitrogène et carbone conduisant à la formation de radicaux thiyls (GS) (Halliwell & Gutteridge, 1999).

En dehors de son effet scavenger des ROS, le glutathion a un rôle de co-facteur pour plusieurs enzymes impliquées dans la défense antioxydante, et dans le stress induit par les métaux lourds et les xénobiotiques (Penninckx, 2002).

Les personnes en bonne santé bénéficient aussi d'un haut niveau de glutathion augmentant leur potentiel à combattre les toxines, les maladies infectieuses, les

cellules précancéreuses et le processus de vieillissement lui-même. La diminution des niveaux de glutathion est caractéristique du vieillissement et est particulièrement évidente dans le cas des maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Aslund et al., 1994).

I-7-La Relation entre le GSH et les autres Antioxydants

Le GSH est considéré comme le principal antioxydant cellulaire parce qu'il complète l'action d'un grand nombre d'autres antioxydants par exemple, les vitamines C et E ne peuvent fonctionner adéquatement sans GSH, lorsqu'elles captent un oxyradical, elles doivent le remettre au système GSH afin de pouvoir retourner en chercher d'autres. C'est le GSH, et non pas la vitamine, qui le neutralise (Gutman & Shettini, 1993).

I-8-Les Autres Antioxydants

Toute substance qui présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat.

I-8-1-les vitamines

Ce sont des substances dont l'organisme ne peut en général faire la synthèse, nécessaire à la croissance de l'organisme, agissant à doses minimes, dépourvues de valeur calorique intrinsèque, et qui doivent être apportées par le régime alimentaire. Les vitamines ont le plus souvent, un rôle de cofacteur dans les systèmes enzymatiques et membranaires (Jacotot et al., 1989).

I-8-1-1-La vitamine C (acide ascorbique)

Est un composé réducteur qui agit en synergie avec α -tocophérol (vit E), en permettant sa régénération lui-même étant ensuite régénéré par une NADH réductase (Delattre et al., 2003). C'est un excellent piègeur des radicaux libres, qui peut protéger divers substrats biologiques de l'oxydation (empêche l'oxydation des LDL) (Pincemail, 2004).

I-8-1-2-la vitamine E

Un antioxydant qui neutralise les radicaux libres et contribue à ralentir l'oxydation des acides gras insaturés et du cholestérol empêchant ainsi les dommages dus à l'oxydation des membranes cellulaires et l'athérosclérose (Delattre et al., 2003). L'action pourrait s'exercer préférentiellement au niveau des membranes cellulaires car la chaîne iso-prénoïde de cette vitamine lui facilite l'accès et le mouvement en milieu hydrophobe (Louisot, 1989). Grâce à sa fonction phénol, la vitamine E arrête la peroxydation en captant les radicaux libres. Le mécanisme de piégeage des radicaux libres est indiqué dans la figure 4.

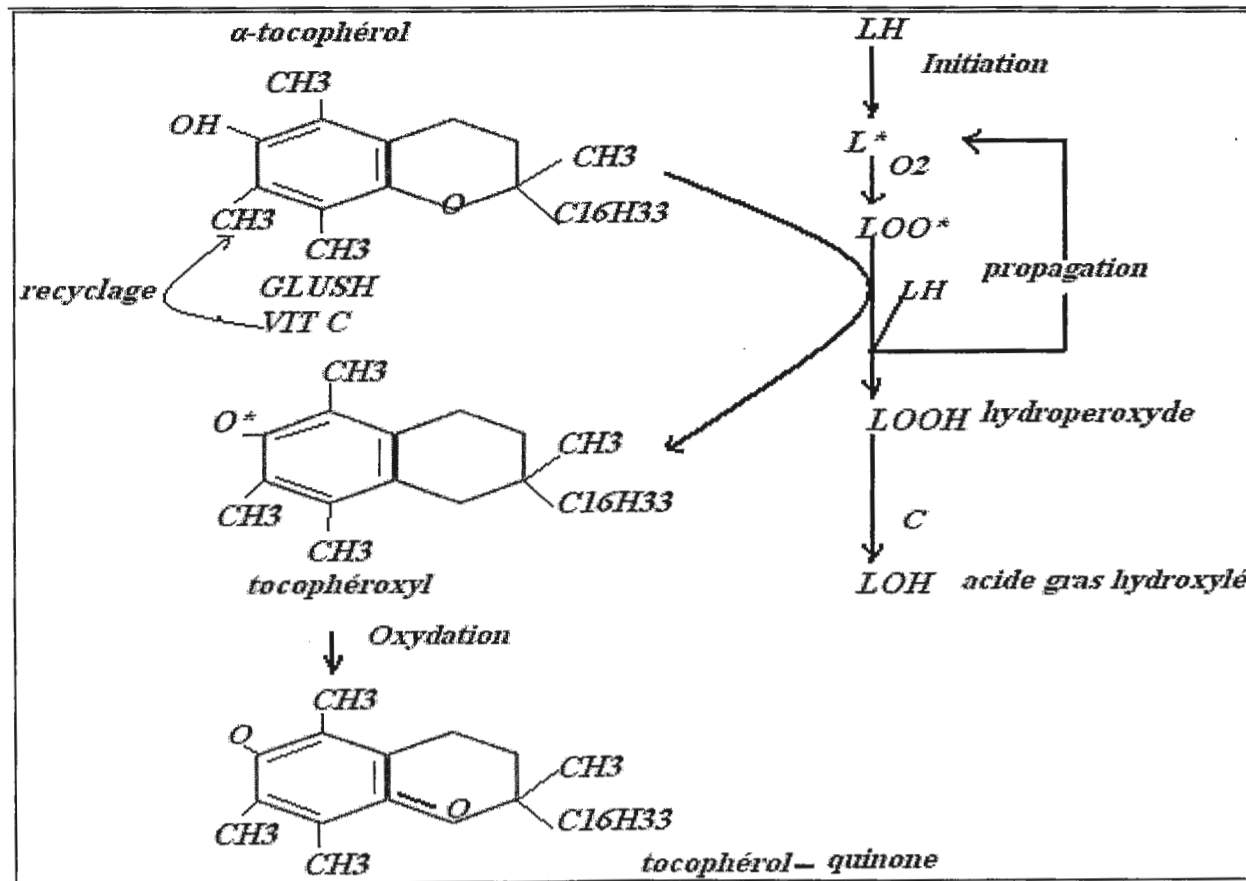
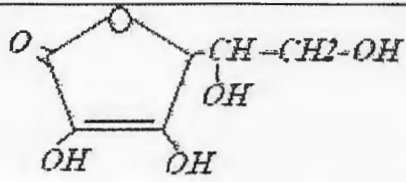
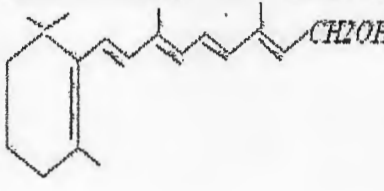
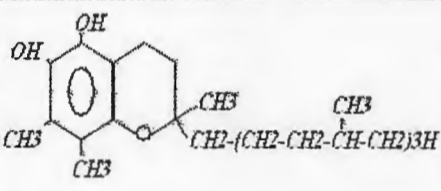
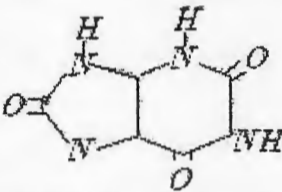
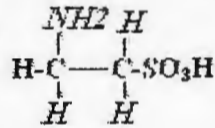


Figure 4: Mécanisme de piégeage des RL par la vitamine E (Karleskind, 1992)

Le tableau 2 ci-dessous résume les structures des vitamines ayant des activités antioxydantes traduites par leurs effets scavengers contre les radicaux libres concernés.

Tableau 2: Mécanismes protecteurs non enzymatiques contre les espèces oxygénées réactives et les radicaux libres (Reichl et al., 2004).

Substance	Structure	Fonction
Acide ascorbique (vitamine C)		Captation de O_2^- , OH , H_2O_2 , O_2 singulet
Vitamine A		Captation de O_2^- singulet
α -tocophérol		Captation de $RO\cdot$
Acide urique		Captation de $OH\cdot$, $ROO\cdot$ ET O_2 singulet
Taurine		Captation de $OH\cdot$, $ROO\cdot$ ET O_2 singulet
Glutathion	γ -Glu-Cys-Gly	Captation de $OH\cdot$, $ROO\cdot$, O_2^- , $RO\cdot$



Chapitre II
le système de détoxification enzymatique

II- Le Système de Détoxification Enzymatique Glutathion Dépendant

Les fonctions de détoxification au niveau rénal et hépatique essentiellement sont assurées par un certain nombre d'enzymes ayant pour rôle de neutraliser les radicaux libres et protéger ainsi la cellule.

II-1- La Glutathion S-Transférase (GST) :

II-1-1-Définition

Les glutathion S-Transférase [GST:EC.2.5.18] comptent parmi plusieurs systèmes de détoxification chez tous les animaux (O'Brien et al., 1996). Ils représentent une importante famille cytosoliques d'isoenzymes polymorphes.

Les GST sont des enzymes solubles avec une masse moléculaire d'environ 25 KDa, dimériques et largement répandues dans la faune et la flore. Chaque sous unité GST porte deux sites de fixation : le premier spécifique du glutathion réduit (GSH), site «G», alors que le second l'est pour le substrat proprement dit, site «H». De plus, certaines GST (au moins les GST A et P) possédant un troisième site non spécifique qui serait soit impliqué dans le transport des molécules hydrophobes comme la bilirubine, soit comme un site régulateur qui supprimerait parfois l'activité de l'enzyme allostérique (Van Bladeren, 2000).

II -1-2-Localisation et Propriétés Physicochimiques des GST

La localisation tissulaire et les caractéristiques physico-chimiques des GST sont indiquées dans les tableaux 3 et 4 suivants :

Tableau 3: Nomenclature, localisation chromosomique et caractéristiques physico-chimiques des GST humaines les plus étudiées (Habdous et al., 2004).

Classes	Enzymes	Autres nomenclatures	AA	PM	PI	Gènes	Localisation chromosomique
Alpha							
hGSTA1	hGSTA1-1	GST2-type 1 ou GSTε	222	26,9	8,9	<i>hGSTA1</i>	6p12.1
hGSTA2	hGSTA2-2	GST2-type 2 ou GSTγ	222	26,9	8,4	<i>hGSTA2</i>	6p12.1
hGSTA3	hGSTA3-3		nd	nd	nd	<i>hGSTA3</i>	6p12.1
hGSTA4	hGSTA4-4		222	25,7	5,8	<i>hGSTA4</i>	6p12.1
hGSTA5	hGSTA5-5		nd	nd	nd	<i>hGSTA5</i>	6p12.1
Mu							
hGSTM1	hGSTM1a-1a	GST1-type 2 ou GSTμ	218	26,7	6,1	<i>hGSTM1</i>	1p13.3
	hGSTM1b-1b	GST1-type 1 ou GSTψ	218	26,6	5,5	<i>hGSTM1</i>	1p13.3
	hGSTM1a-1b	GSTμ/ψ	218	26,6	5,8	<i>hGSTM1</i>	1p13.3
hGSTM2	hGSTM2-2	GST4	218	26,3	5,4	<i>hGSTM2</i>	1p13.3
hGSTM3	hGSTM3-3	GST5	225	26,5	5,2	<i>hGSTM3</i>	1p13.3
hGSTM4	hGSTM4-4		218	26,4	5,2	<i>hGSTM4</i>	1p13.3
hGSTM5	hGSTM5-5		218	26,0	nd	<i>hGSTM5</i>	1p13.3
Pi							
hGSTP1	hGSTP1-1	GST3 ou GSTπ	210	23,0	4,8	<i>hGSTP1</i>	11q13.3
Thêta							
hGSTT1	hGSTT1-1	GSTθ	240	26,7	4,6	<i>hGSTT1</i>	22q11.2
hGSTT2	hGSTT2-2	GSTT2	244	25,1	nd	<i>hGSTT2</i>	22q11.2

AA = nombre d'acide aminé par sous-unité ; MM : masse moléculaire d'une sous-unité exprimée en kilodalton (kDa) ; PI : point isoélectrique ; nd = non déterminé.

**Tableau 4 : Localisation tissulaire des GST les plus étudiées
(Habdous et al., 2004)**

Enzymes GST	Alpha		Mu					Pi	Thêta	
	A1/2	M1-1	M2-2	M3-3	M4-4	M5-5	P1-1	T1-1	T2-2	
Érythrocyte	-	-	-	-			±	+		
Cerveau	±	+	+	++	+	+	++	-		
Vessie	+	+					++			
Peau	++	±	-	-			++	-		
Coeur	±	+	(+)	(+)	(+)	(+)	++	-		
Testicule	++	+	+	++	++	+	+			
Foie	++	+	(+)	(±)	+	-	(+)	+	+	
Poumon	+	+	(+)	(+)	(+)	+	++	-		
Lymphocytes		+								
Estomac/intestin	+	±					+			
Muscle	-	+	++	-	+	-	++	-		
Rein	+	+	(+)	-	+	-	+	-		
Ovaire	+				+		+			
Pancréas	+	(+)			+	-	+			
Placenta	-	-	-	-	+	-	++	-		
Prostate	+						++			
Utérus	+				+		+			

++ : expression forte ; + : expression moyenne ; (+) : expression faible ; - : pas d'expression.

II-1-3- Rôle et Mécanisme d'Action des GST

Les fonctions biologiques accomplies par les GST sont diverses, les plus importantes sont la détoxification des xénobiotiques, les transports endogènes (les hormones) (Habdous et al., 2004). Les conjugués subissent ultérieurement une coupure enzymatique et une acétylation pour former des dérivés N-acétylcystéine (acide mercapturique) du toxique, facilement excrétés (Clu et al., 1992). Donc, la réaction de conjugaison aboutit à la formation de l'acide mercapturique qui sera ensuite excrété via la bile ou le rein (Habdous et al., 2004).

Récemment plusieurs études suggèrent que les GST jouent aussi un rôle antioxydant important permettant de protéger les cellules des dommages occasionnés par les radicaux libres (hydroxyliperoxydes, quinones et les carbamyles a, b insaturés (Habdous et al., 2004). Bien que la grande majorité des xénobiotiques soit neutralisée par les GST, il existe plusieurs cas pour lesquels la catalyse impliquant ces enzymes ne conduit pas à une détoxification complète (Van Bladeren, 2000). Ainsi, certains conjugués GS néoformés sont instables et peuvent être clivés donnant des métabolites souvent très toxiques. Le processus de thiolyse rend la détoxification du conjugué GS incomplète et expose la cellule à la menace chimique du métabolite.

Ainsi, la conjugaison GST-dépendante semble être réversible, permettant sous certaines conditions la régénération des composés «parental» cytotoxique. Ce cas de

figure est rencontré lors de la catalyse GST-dépendante des isothiocyanates (Van Bladeren, 2000). La réversibilité de la réaction de conjugaison signifie que les conjugués GS constituent des formes temporaires de stockages et de transport plutôt qu'une détoxification proprement dite (Van Bladeren, 2000 ; Habdous et al., 2004).

Les (GST) impliquées dans la conjugaison du glutathion réduit à des composés électrophiles nocifs et dans la chimiorésistance aux agents anticancéreux, occupent une place très importante dans le système de défense cellulaire. Elles détoxiquent ainsi les composés carcinogènes. Plusieurs études épidémiologiques ont examiné l'incidence de leurs polymorphismes génétiques sur le risque de survenue et/ou l'aggravation de nombreuses pathologies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et des maladies respiratoires, l'étude de ces dernières montre qu'il existe un lien entre certains variants alleliques GSTP1 et l'asthme (Habdous et al., 2004).

Des exemples de produits chimiques (époxyde et dérivés aromatiques halogénés) qui se conjuguent au GSH sont présents dans la figure 5 :

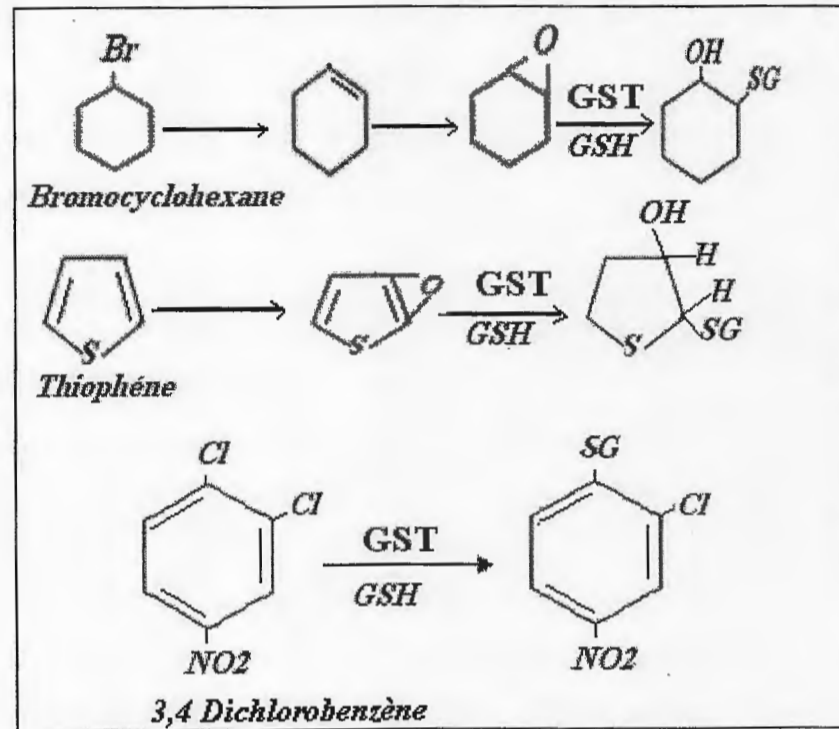


Figure 5 : Conjugaisons des époxydes et déshalogénéation catalysées par la GST (Clu et al., 1992)

II-2- La Glutathion Peroxydase

II-2-1- Définition

Les peroxydases sont des enzymes capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (en particulier d'origine lipidique). En couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur. La dénomination des peroxydases dépend de la nature de ce substrat réducteur, dont chaque enzyme est spécifique. Ainsi il est possible de distinguer des glutathion peroxydases, des

cytochromes c peroxydases, des NADH peroxydases.

Du point de vue de la réactivité, la GSH-Px catalyse la réduction des hydroperoxydes en alcools, moins réactifs, tandis que le glutathion réduit (GSH) est transformé en Glutathion oxydé (GSSG).



ROOH pouvant être un hydroperoxyde d'acide gras, de cholestérol (estérifiés ou non) ou un hydroperoxyde synthétique (Delattre et al., 2003).

La GPx est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries (Allain, 2006).

II-2-2- Structure

La GPx est une enzyme tétramérique, avec un poids moléculaire de 48.000 Da (Allain, 2006). Le site actif de la glutathion peroxydase contient un résidu d'un aminoacide inhabituel: La sélénocystéine dans laquelle l'atome de soufre de la cystéine est remplacé par un atome de sélénium (figure 6).

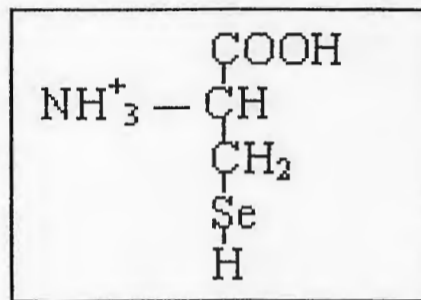


Figure 6 : Structure de la Sélénocystéine (Voet, 1998).

L'enzyme Glutathion peroxydase a besoin pour son activité et sa production de cofacteur inorganique (Se).

Le sélénium est un antioxydant métalloïde de propriétés chimiques voisines de celles du soufre, il entre dans la composition de certaines enzymes. Il s'agit d'un oligoélément dont la teneur dans l'organisme est étroitement dépendante de l'alimentation (Viande, fruits de mer, céréales) est surtout présent lié aux protéines sous forme de sélénométhionine et de sélénocystéine (Vitoux et al., 1996).

Sous forme de résidus sélénocystéine (Vitoux et al., 1996) (l'atome de soufre de la cystéine est remplacé par un atome de sélénium).

Une carence en sélénium entraîne; une diminution de l'activité de la GPx et une réduction concomitante de l'épuration des peroxydes ; l'augmentation de l'oxydabilité des lipoprotéines de haute densité (HDL); diminution de la protection vis-à-vis de métaux lourds cardiotoxiques; une toxicité accrue de substances exogène (Vitoux et al., 1996).

II-2-3-Classification des Glutathion Peroxydases

La classification des GPx se fait selon la localisation :

-La GPx « classique », présente pour 90% dans le cytosol et pour 10% dans les mitochondries.

-La GPx plasmatique.

-La GPx membranaire (phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase).

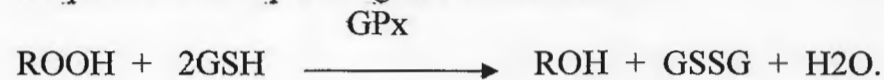
Il existe d'autre forme d'isoenzyme de GPx c'est la GPx extracellulaire (eGPx).

II-2-4-Mécanismes d'actions des GPx

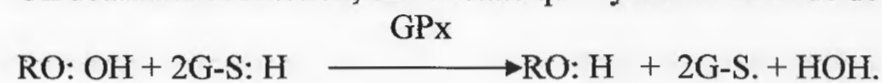
La glutathion peroxydase semble plus importante que la catalase. Elle s'attaque non seulement à H₂O₂ mais aussi autres hydroperoxydes y compris des hydroperoxydes lipidiques sauf les peroxydes des acides gras constitutifs des phospholipides (Van Kuijk et al., 1987).

Le mécanisme catalytique comporte une oxydation par ROOH suivie de la liaison successive des deux molécules de glutathion (Delattre et al., 2003).

On peut écrire l'équation générale suivante :



On détaillant la réaction, on constate qu'il y a formation de deux radicaux thiyles GS. :



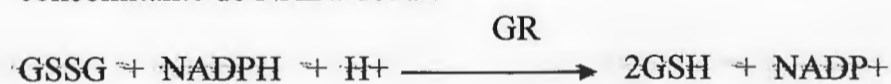
Les radicaux dimérisent pour former un dissulfure GSSG (Delattre et al., 2003).

**II-3-La Glutathion Réductase****II-3-1-Définition**

La Glutathion réductase est une enzyme presque ubiquitaire qui catalyse la réduction NADPH-dépendant de glutathion. Cette Enzyme se trouve dans le cytosol et dans les mitochondries, dans laquelle se trouve la glutathion peroxydase (Demers, 1999).

II-3-2- Rôle et Mécanisme d'action de la Glutathion Réductase

Le rôle de la glutathion réductase est de régénérer le glutathion, par oxydation concomitante de NADP réduit



Cette réaction donne dans les conditions normales un rapport GSH/GSSG supérieur à 100/1. Ce qui permet au GSH de fonctionner comme agent réducteur intracellulaire.

Le GSH intervient aussi comme coenzyme dans plusieurs réactions de réduction enzymatiques et joue un rôle important dans le transport d'acides aminés dans certaines cellules (Delattre et al., 2003).

II-3-3- Interdépendance enzymatique GPx-GR

Le fonctionnement des GSH peroxydases exige un nombre important de molécules de glutathion réduit. Il se produit une accumulation de dissulfure GSSG. La GSH réductase réduit les dissulfures GSSG et reconstitue le stock de GSH (Smith & Boyd 1984 ; Meister, 1994). Le peroxyde d'hydrogène est décomposé par la glutathion peroxydase en présence de glutathion réduit (GSH) qui donne les électrons et les protons nécessaires. Le glutathion oxydé (G-S-S-G) est réduit à son tour par les électrons de NADPH, H⁺ en présence de glutathion réductase (Servais, 2004) (figure 7).

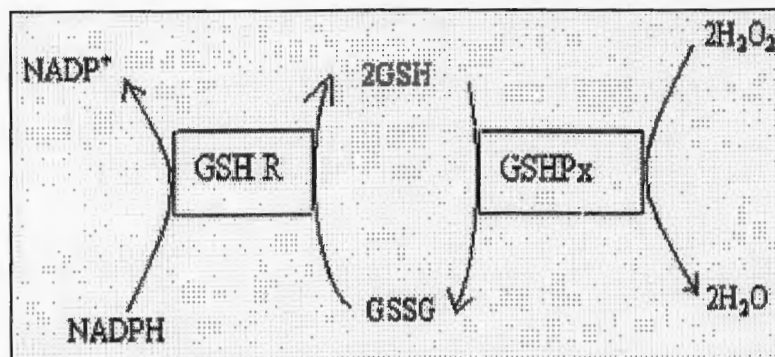


Figure 7 : Restitution du GSH par la Glutathion Réductase (Smith & Boyd, 1984 ; Meister, 1994)

II-4- La Gamma-Glutamyl Transpeptidase (GGT)

II-4-1-Définition

La GGT (γ -GT, E.C. 2.3.2.1.) est une enzyme glycoprotéique hétérodimérique dont le poids moléculaire varie selon les espèces et les organes considéré (Laperche, 1989). Il existe 5 à 7 gènes ou pseudogène codant pour la GGT chez l'homme. La demi-vie de la GGT étant comprise entre 14 et 26 jours, son activité devient normalement en 4 à 8 semaines après arrêt de l'agent inducteur (Moussavian et al., 1985).

II-4-2-Localisation de la GGT

La localisation de GGT est membranaire et son site actif extracellulaire (Laperche, 1989). Elle est largement distribuée dans les tissus et les organes et particulièrement abondante dans le tube contourné proximal rénal, le foie, le pancréas, la glande mammaire et les villosités intestinales (Lieberman et al., 1995). Cependant du fait du poids de l'organe c'est le foie qui contient la plus grande quantité de GGT de l'organisme et l'origine de la GGT sérique est de ce fait majoritairement hépatique (Huseby, 1977).

II-4-3- Les Inducteurs de la GGT

La distribution des valeurs de l'activité de la GGT sérique sont dépend de l'index de masse corporelle, de la consommations d'alcool, de la cholestérolémie, de la glycémie, du tabagisme, de la prise de contraceptifs oraux et de la pression artérielle. Ces facteurs sont positivement corrélés à l'activité sérique de la GGT alors que la consommation de café et l'activité physique sont inversement corrélés (Nilssen et al., 1990 ; Robinson, 1989 ; Wannamethee et al., 1995).

II-4-4- L'activité Sérique de la GGT

L'activité sérique de la GGT est comprise entre 10 et 40 UI/L chez 95% des adultes normaux avec les méthodes de dosage les plus couramment utilisées (Schiele et al., 1977). Elle augmente jusqu' à l'âge de 50 ans puis décroît au-delà de cet âge. Elle est significativement plus importante chez l'homme que chez la femme et chez les nouveau-nés jusqu'à l'âge de un an.

La normalisation de l'activité sérique de l'enzyme après l'arrêt du médicament inducteur est utile pour établir l'origine médicamenteuse de l'augmentation de la GGT. Si l'anomalie persiste après l'arrêt d'un traitement inducteur enzymatique, une toxicité hépatique ou une autre cause doit être évoquée (Lepicard et al., 1994).

II-4-5- Rôle et Mécanisme d'Action de la GGT

La GGT catalyse l'hydrolyse des molécules peptidiques contenant un groupement gamma-glutamyl par une réaction d'hydrolyse ou de transpeptidation correspondant au transfert du groupement glutamyl d'un donneur à un accepteur (Meister & Tate, 1976).

Cette enzyme facilite le transport extra-intracellulaire des acides aminés (Groscurth et al., 1977). C'est la seule enzyme capable de cliver le glutathion et ses sulfo-conjugués en quantité importante. Elle représente l'enzyme clé du cycle gamma-glutamyl permettant le recyclage sérique. En effet le glutathion sérique n'étant pas capable de pénétrer dans la cellule sous forme de tripeptide, son clivage par la GGT permet la captation des acides aminés en particulier de la cystéine destinée à la synthèse de glutathion intra cellulaire.

La GGT joue également un rôle important dans le métabolisme de certaines molécules endogènes et exogènes comme les xénobiotiques ou les carcinogènes. En effet, la biotransformation des molécules, une fois conjuguées au glutathion transférase, nécessite un clivage par la GGT avant l'obtention d'un dérivé s-cystéine (Lieberman et al., 1995) la figure 8 ci-dessous montre le cycle gamma glutamyl.

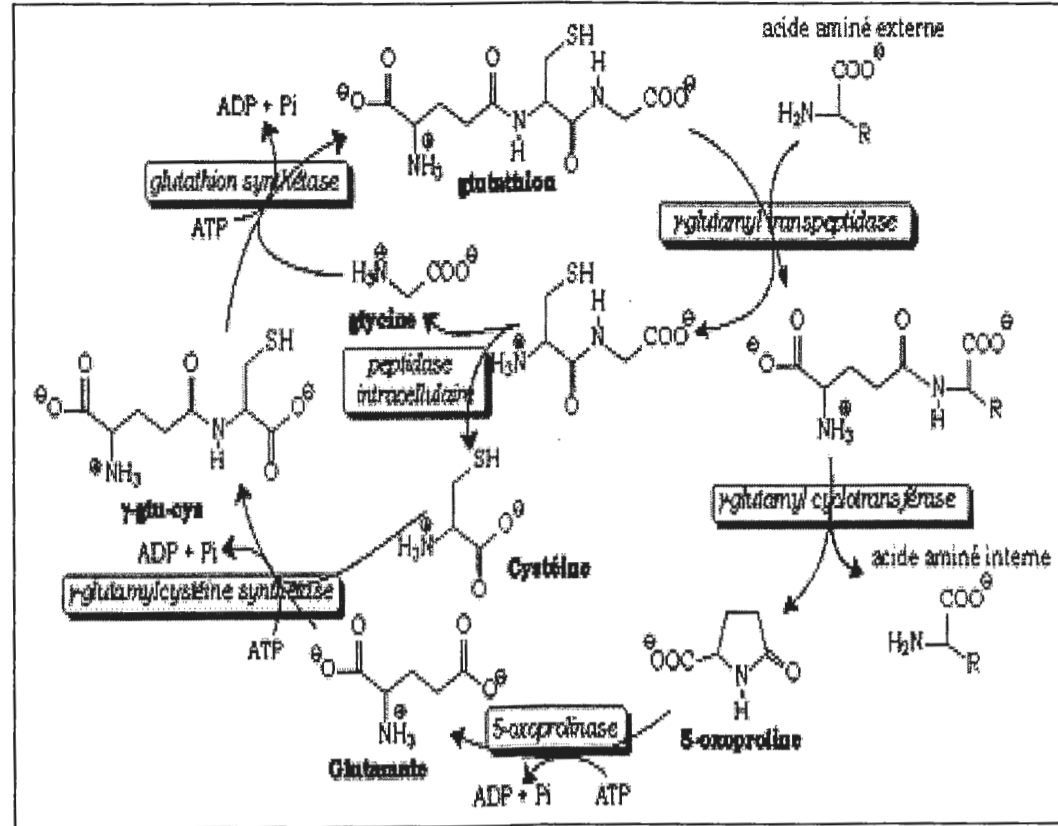


Figure 8: Cycle Gamma Glutamyle (Aslund et al., 1997).

Chapitre III
Les médicaments anti cancéreux

III-Les Médicaments Anticancéreux

III-1- Définition

Les anticancéreux sont des médicaments utilisés dans le traitement des cancers en chimiothérapie à côté de la radiothérapie et de la chirurgie (Talbert et al., 2004). Ils ont pour but de détruire les cellules tumorales (Becouarn, 1993).

Pour être activée, une substance anticancéreuse devra détruire la totalité des cellules tumorales. Or cela nécessite un très haut degré de spécificité de la substance et l'emploi des doses massives, ce qui entraîne obligatoirement un effet toxique pour les cellules saines. Toutes les substances anti-cancéreuses connues à ce jour, agissent de façon non sélective, mais la sensibilité des cellules cancéreuses étant beaucoup plus élevée le tissu tumoral sera détruit en priorité (Sevenet, 1994).

Les médicaments anticancéreux sont prescrits et administrés dans le cadre de protocoles spécifiques du type et du stade du cancer, tout en tenant compte de l'état générale du patient (Talbert et al., 2004).

III-2- Toxicités des Médicaments Anticancéreux

L'utilisation des médicaments anticancéreux reste limitée par leur toxicité aiguë et chronique. A de rares exceptions près, l'index thérapeutique reste faible. Les toxicités aiguës, les premières observées, sont maintenant mieux comprises et pour certaines d'entre elles efficacement prévenues par des mesures symptomatiques appropriées. A l'inverse les complications chroniques plus rares et cumulatives, sont devenues une préoccupation réelle avec l'augmentation des survivants à long terme et des sujets guéris (Lechat et al., 1990).

III-2-1-Toxicité Aiguë:

Ce type de toxicité s'observe de quelques heures à quelques jours après l'administration d'un médicament et dure de quelques heures à huit semaines, leur incidence et leur sévérité sont souvent liées à la dose administrée, et peuvent dépendre de manière importante de la mortalité d'administration (Lechat et al., 1990).

III-2-2-Toxicité Chronique

Elle sont mieux connues maintenant, Il s'agit de toxicité qui se manifeste après plusieurs administrations d'un, ou le plus souvent, de plusieurs médicaments anticancéreux. Cette toxicité peut être médullaire, et responsable de cytopénie très prolongée de façon irréversible (Lechat et al., 1990). A côté de ces avantages, la chimiothérapie a des effets secondaires majeurs (hépatotoxicité, toxicité cardiaque, toxicité neurologiques, toxicité digestive, hémato toxicité et néphrotoxicité) (Schorderet, 1992).

III-3-Classification des Médicaments Anticancéreux

Une classification fondée sur le mode d'action est aléatoire car pour certains anticancéreux, ce mode d'action est imparfaitement connu ; Pour d'autres, il fait intervenir plusieurs mécanismes.

Une classification est donc fondée; soit sur le mécanisme d'action, soit sur l'origine, naturelle ou synthétique de la substance (tableau 5) (Moulin & Coquerel, 1998).

**Tableau 5 : Classification des Médicaments Anticancéreux
(Moulin & Coquerel, 1998).**

Anticancéreux	Les différentes espèces	Les exemples
Antimétabolites	Analogues des bases puriques	6-mercaptopurine : Purinethol® Cladribine : Leustatine®
	Analogues des bases pyrimidiques	Capécitabine : Xeloda® Gemcitabine : Gemzar®
	Analogues de l'acide folique	Méthotrexate® Raltitrexed ®: Tomudex ®
Agents alkylants	Moutardes à l'azote	Chlorambucil :Chloraminophene® Cyclophosphamide :Endoxan®, Famisas®
	Ethyléminines et hexaméthylmélamine	Thiolépa : Thiotepa® Ledenle Altrétamine : Hexastat ®
	Alkylsulfonates	Busulfan : MYLERAN®
	Nitro-urées	Carmustine : BICNU® Streptozocine : ZANOSTAR®
Substances naturelles	Inhibiteurs du fuseau	Vinorelbine : NAVELBINE® Vindésine : ELDSISINE®
	Antibiotiques concérostatiques	Doxorubicine: ADRIBLASTINE ® Mitomycine: AMETYCINE®
	Inhibiteurs des topo-isomérases I	Irinotecan: CAMPTO®
	Enzymes	L-Asparaginase: Kidrolase®
	Agent différenciateur	Tretinoïne: VESANOID®
Hormones et anti hormones	oestrogènes	Fosfestrol®: ST-52
	Anti-oestrogènes	Torémifène: TARESTON® Letrozole: FEMARA®
	androgènes	Noréthisterone: NORFOR
	Anti- androgènes	Cyprotérone: ADROCUR® Bicalutamide: CASODEX®
Agent divers	Anthracyclines synthétiques	Mitoxantrone: NOVANTRONE® Elliptium: CELIPTIUM®
	Anticorps monoclonaux	Rituximab: MABTHERA ® Trastuzumab: HERCEPTIN®
Immuno stimulants	Interférons	Interferon α_{2a} : ROFERON-A® Interféron A $_{2b}$: Interona
	Interleukines	Aldesleukine : PROLEUKIN®

III-4-Mécanisme D'action des Anticancéreux

Les médicaments anticancéreux ou leur métabolites actifs peuvent agir directement sur l'ADN ou indirectement par l'inhibition des réactions nécessaires au maintien de son intégrité, à sa réplication ou sa transcription (Lechat et al., 1990).

III-4-1-Interaction Directe avec l'ADN**III-4-1-Alcoylation**

Un agent alcoylant (ou alkylant) est un agent capable de remplacer un proton d'une autre molécule par un radical alcoyl. Les réactions d'alcoylation aboutissent à des ponts intracaténaux, à des ponts inter-brins ou à des ponts ADN -protéines (Lechat et al., 1990).

III-4-2-Intercalation

Les molécules intercalantes sont des molécules polycycliques capables de se glisser entre paire de base contiguës de la double hélice d'ADN. Cette intercalation modifie la conformation spatiale de l'ADN entraînant inhibition des synthèses d'ADN, d'ARN et de protéines. Cette intercalation est responsable de cassures de la molécule d'ADN (Lechat et al., 1990).

III-4-3-Cassures de l'ADN par la formation de radicaux libres

Certains médicaments anticancéreux sont générateurs des radicaux libres capables d'entraîner secondairement une cassure de l'ADN (Lechat et al., 1990).

III-4-2-Interaction indirecte avec l'ADN**III-4-2-1-Anti-métabolites**

Ils interfèrent avec une ou plusieurs étapes enzymatiques essentielles à la synthèse de l'ADN. Ces médicaments après métabolisation exercent trois types d'action du fait leur parenté structurale avec les intermédiaires physiologiques: incorporation frauduleuse dans les acides nucléiques, inhibition compétitives, par excès de substrat, d'une ou plusieurs réactions enzymatiques, inhibition irréversible d'un enzyme après liaison (Lechat et al., 1990).

III-4-2-2-Inhibition de la topo-isomérase 2

Plusieurs agents anticancéreux induisent des cassures de l'ADN en interagissant directement avec une enzyme impliquée dans la transcription et la réplication de l'ADN, la topo-isomérase II (Lechat et al., 1990).

III-4-2-3-Interaction avec les Protéines Cellulaires

Il s'agit essentiellement des alcaloïdes de la pervenche qui interagissent avec le système micro tubulaire essentiel à la formation du fuseau mitotique (Lechat et al., 1990).

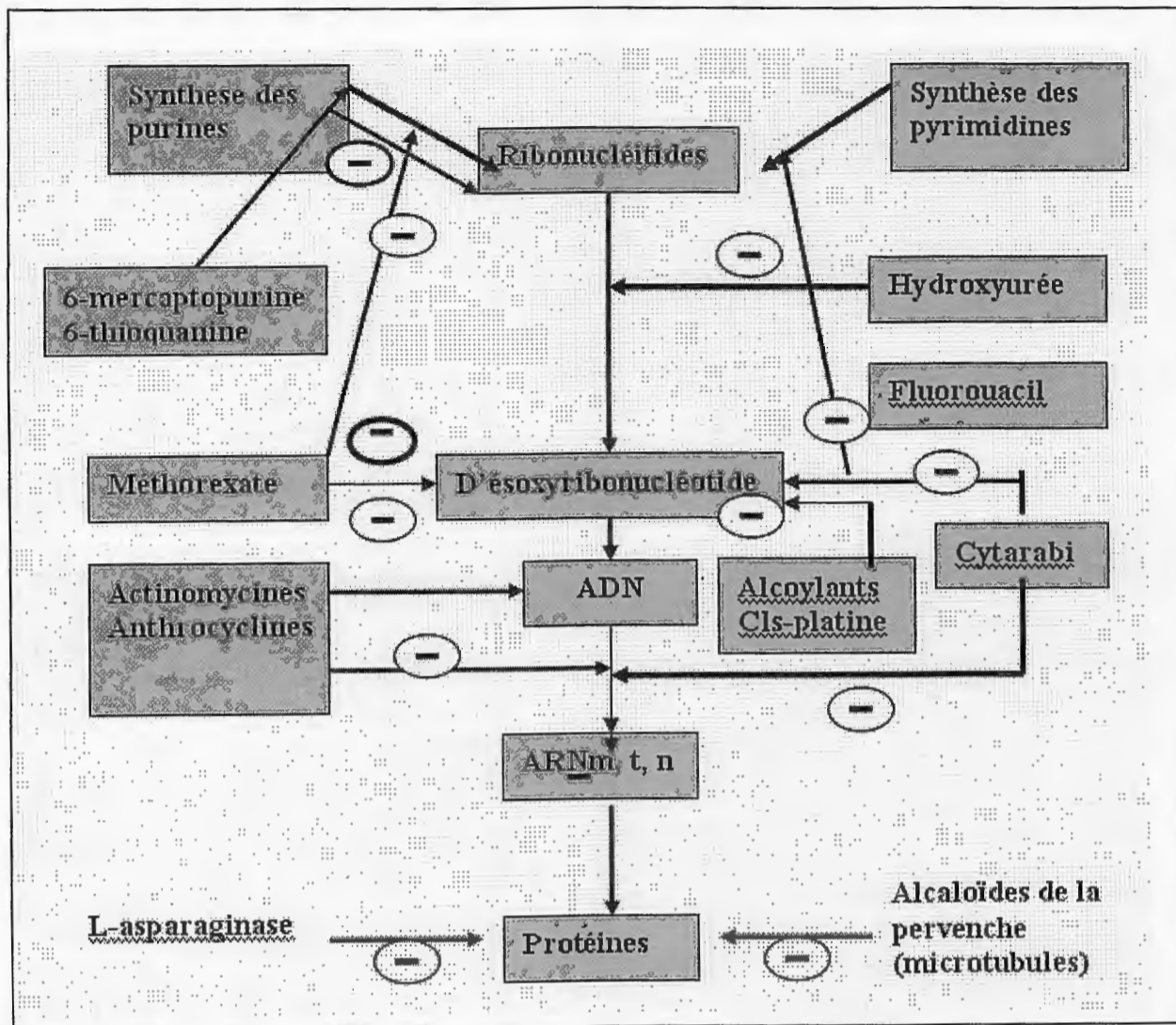


Figure 9 : Sites d'action des principaux médicaments anticancéreux (Lechat et al., 1990)

III-5- Exemple sur les Médicaments Anticancéreux « Cyclophosphamide »

III-5-1-Définition

Le Cyclophosphamide (Fomisas®) est un médicament anticancéreux appartenant à la famille des oxazophorines. Ce médicament présente la particularité d'être un dépresseur de l'immunité cellulaire (lymphocyte T) et (lymphocyte B). Il est utilisé comme immuno dépresseur dans le rejet de greffe, les collagénoses, les glomérulonéphrites. Mais il présente un risque de carcinogènes à long terme (Touitou,

III-5-1-Définition

Le Cyclophosphamide (Fomisas®) est un médicament anticancéreux appartenant à la famille des oxazophorines. Ce médicament présente la particularité d'être un dépresseur de l'immunité cellulaire (lymphocyte T) et (lymphocyte B). Il est utilisé comme immuno dépresseur dans le rejet de greffe, les collagénoses, les glomérulonéphrites. Mais il présente un risque de carcinogènes à long terme (Touitou, 2004). Il est indiqué pour le cancer : du sein, de l'ovaire, du poumon, du testicule, de la vessie, le lymphome hodgkinien et non hodgkin (Talbert et al., 2004).

III-5-2-La structure chimique développée

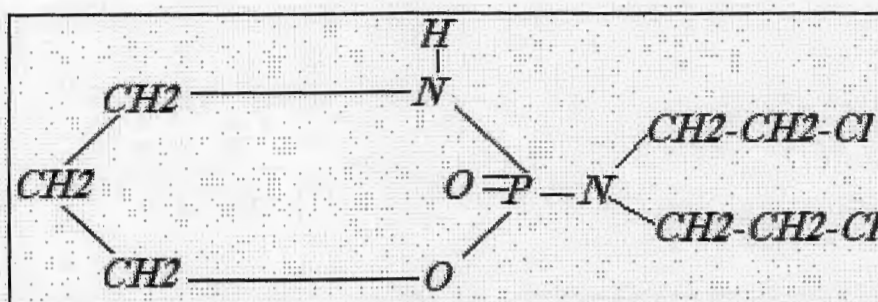


Figure 10 : Structure chimique du Cyclophosphamide (Schorderet, 1989)

III-5-3-Posologie et Mode d'Administration

Le cyclophosphamide est habituellement utilisé après dilution dans l'eau (à raison de 50 ml pour 1g), la solution ainsi reconstituée ne doit pas être conservée au delà de 24 h. Cette solution aqueuse est introduite dans le liquide de perfusion (solutions isotoniques de NaCl ou de glucose) sans dépasser la concentration de 2%.

La voie d'administration habituelle est la voie veineuse en perfusion courte (de 30 minutes à 2h); les doses moyennes sont 150 à 1200 mg/m² chez l'enfant, de 500 à 4000mg/m² chez l'adulte administrées soit sur 1 à 3 jours à chaque cycle, soit en deux injections à 7 jours d'intervalle (AFECT., 2003).

III-5-4-Pharmacocinétique

Le médicament est converti sous l'action d'enzymes microsomiales hépatiques, et peut être directement par les cellules tumorales, en 4 heures. Le cyclophosphamide peut être dégradé en métabolites inactifs dans le foie, voie en équilibre avec la formation d'aldophosphamide. Celui-ci en solution dans les liquides biologiques, se transforme spontanément en moutarde phosphoramidée, qui est agent alcoylant bi fonctionnel, et en acroléine; l'élimination d'acroléine est urinaire et son accumulation entraîne des phénomènes de types irritatif au niveau des voie urinaires excrétrices avec hémorragies, généralement d'origine vésicale. La moutarde phosphoramidée entraîne donc

l'alcoylation des molécules cible ou est détoxifiée, transformée en métabolites inactifs et atoxiques excrétés par voie urinaire.

Si les médicaments activant les cytochromes P450 ne semble pas modifier *in vivo* l'activité du cyclophosphamide, les anomalies fonctionnelles hépatiques perturbent les réactions de bio-activation et de détoxification. La demi-vie plasmatique du cyclophosphamide est de l'ordre de 6 à 8 heures. L'absorption orale du produit est suivie d'un pic plasmatique après 1 heure, mais les taux plasmatiques sont variables d'un malade à l'autre (Touitou, 2004).

III-5-5- Effets Secondaires

Les effets indésirables du Cyclophosphamide varient selon la dose administrée parmi laquelle: myélosuppression, plus marquée avec le cyclophosphamide est dose dépendante, non cumulative et irréversible. Les nausées, vomissements et alopecie sont liés à la dose et identiques à ceux observés avec les autres moutardes azotées. Des cas de nécrose hémorragique myocardique aigue sont rapportés chez 3-10% des sujets recevant des doses unitaires élevées de cyclophosphamide (>2g/m²) (Schorderet, 1989).

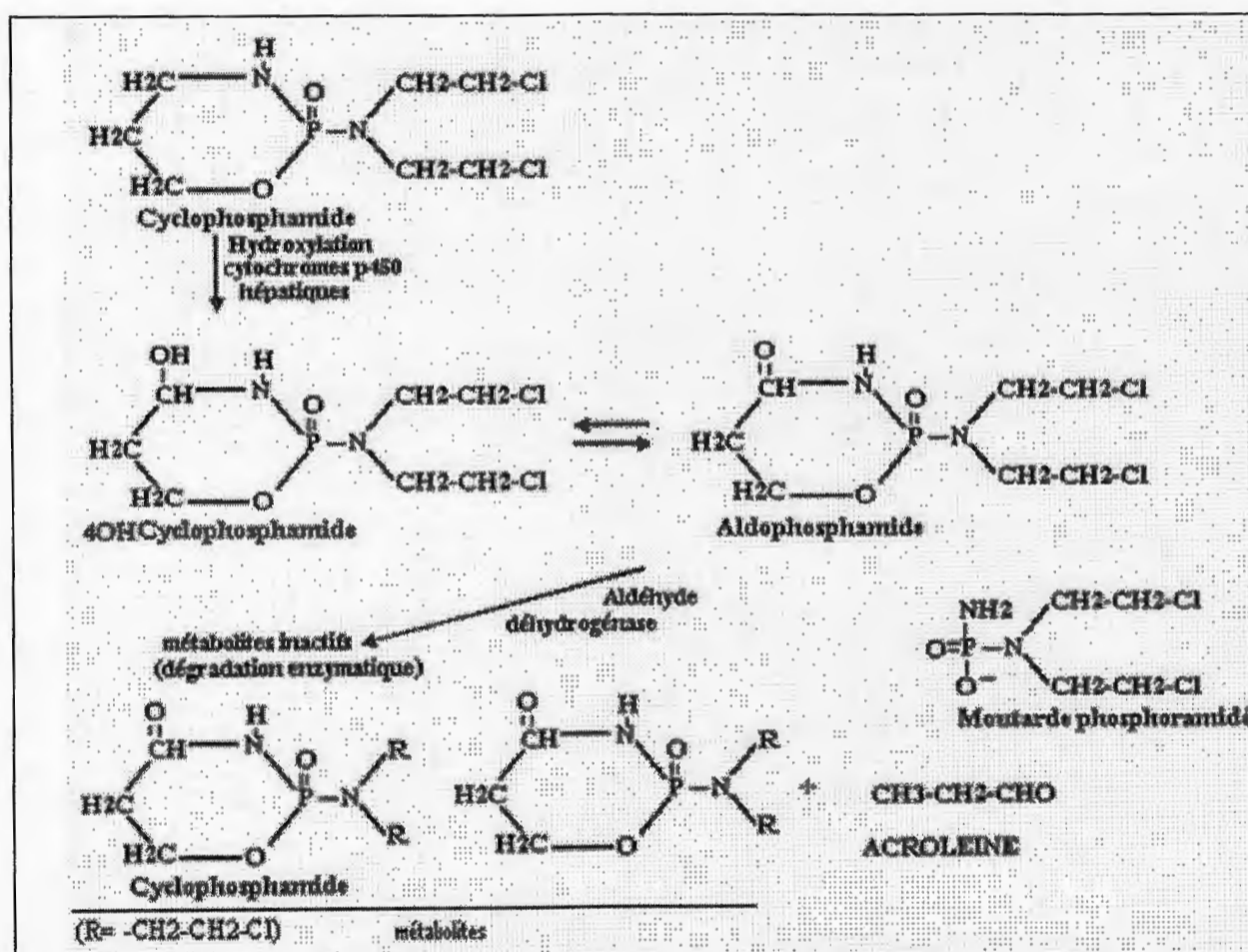


Figure 11 : Activation Métabolique du Cyclophosphamide (Schorderet, 1989).

Chapitre IV

La propolis : source de flavonoïdes

IV- La Propolis : Source de Flavonoïdes :**IV-1- Définition :**

La Propolis, beaucoup moins anciennement connue que le miel, remonte vraisemblablement à l'Égypte antique et de façon certaine, aux Grecs, (propolis vient du grec: pro, qui signifie: en avant, et de polis: la cité, l'entrée de la ruche). ARISTOTE en parle dans son « Histoire des animaux » et la considère comme « remède aux affections de la peau, plaies et suppurations ».

Connue des Incas chez lesquels elle était utilisée dans le cadre des infections fébriles, la propolis est retrouvée également dans les livres de Médecine de Géorgie à partir du 12^{ème} siècle où elle entre dans la préparation de nombreux remèdes.

En France, on trouve quelques traces de son usage dans le traitement des plaies aux 18 et 19^e siècles, mais c'est surtout à l'occasion de la guerre des Boers en Afrique du Sud, qu'elle connaît son apogée d'utilisation, dans le cadre de ses propriétés désinfectantes et cicatrisantes, du fait des excellents résultats qu'elle procure.

Son utilisation donc, sans avoir été permanente, s'est maintenue au fil des siècles et est à nouveau « redécouverte » de façon relativement récente par de nombreux chercheurs qui s'attachent et s'efforcent progressivement, depuis quelques années, d'expérimenter scientifiquement l'ensemble des données empiriques de ce produit.

La Propolis désigne toute une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillies sur certaines parties (bourgeons et écorces essentiellement) de végétaux (certains arbres principalement) par les abeilles, qui les rapportent à la ruche et qui les additionnent et les modifient vraisemblablement en partie par l'apport de certaines de leurs sécrétions propres (cire et sécrétions salivaires essentiellement) (Burdock, 1998).

IV-2- Caractères physico-chimiques :

La Propolis se présente sous l'aspect d'une substance :

- de consistance variable en fonction de la température ; dure et friable à 15°C, elle devient molle et malléable aux alentours de 30°C et collante ou gluante au-dessus jusqu'à fondre vers 60-70°C en moyenne, mais le point de fusion peut aller jusqu'à 100°C et au-delà,
- chauffée doucement au bain-marie, elle se divise en 2 parties bien distinctes :
 - l'une visqueuse qui tombe au fond,
 - l'autre liquide (cire de propolis) qui surnage à la surface trouve nombreux usages dans le domaine apicole;
- de couleur très variable selon sa provenance, allant du jaune clair (conifères) au brun très foncé, presque noir, en passant par toute une gamme de bruns extrêmement riche et étendue (rougeâtre, verdâtre, etc.),
- de saveur souvent âcre et parfois amère.
- d'odeur variable selon son origine; en général arôme agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille, etc.). Si elle est brûlée, elle

dégage une odeur d'encens très délicate et très recherchée en rapport avec les résines aromatiques qu'elle contient.

- La Propolis est insoluble dans l'eau mais elle est soluble partiellement dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, etc., et seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (Donadiou, 2000)

IV-3- Composition chimique de la Propolis:

La composition de la Propolis est variable selon la source végétale visitée par les abeilles, mais présente tout de même qualitativement de nombreuses substances qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable, constance vérifiée et confirmée par des travaux d'analyse chromatographique effectués sur de très nombreux échantillons. Globalement et généralement, la Propolis recueillie dans la ruche est constituée de:

- 50 à 55% de résines et baumes;
 - 25 à 35% de cire (soit 30% en moyenne)
 - 10% d'huiles volatiles ou essentielles;
 - 5% de pollen (les pollens présents dans la propolis le sont par accident, au même titre que ceux retrouvés partout dans la ruche);
 - 5% de matières diverses organiques et minérales.
- (Marchenay, 1977).

Jusqu'à présent, il a été fractionné et identifié de très nombreux constituants (principalement des composés aromatiques: acide benzoïque et dérivés, quelques aldéhydes, acide cinnamique et ses dérivés, mais les principaux sont de la classe des flavonoïdes: isolés en 1964 et 1969 par Villanveva, Bogdanovsky, Barbier, Gonnet, Lavie): En Vrac:

La composition qualitative et quantitative flavonoidique de la propolis est différentes d'une région à une autre selon la végétation, le climat et les conditions environnementales, le tableau 6 suivant montre la différence entre la composition de la propolis de trois régions.

Tableau 6 : Composition chimiques de la propolis dans différentes régions.

propolis	Composés chimiques	références
propolis brésilienne	*2,2dimethyl-6-carboxyethenyl-2H-1-benzopyran. * 6-propenoic-2, 2-dimethyl-8-prenyl-2H-benzopyranic acid. *3, 5-diprenyl-hydroxycinnamic acid. *3-prenyl-4-hydroxycinnamic acid *Caffeic acid *p-coumaric acid	(Sawaya et al., 2004)
Propolis Européenne	* composés Aromatiques sans groupements phénolique libre acides Phénoliques Flavanones et dihydroflavonols Flavones and flavonols Chalcones glycerides Phenoliques	(Bankova et al., 2002)
Propolis turque	-Alcools aromatiques - acides Aromatic . - terpènes Alcooliques - Esters Aromatiques -Flavanones. -Acide Cinnamic -Flavonoïdes. -Naringénine . -Apigénine . -Crysine.	(Sorkum, 2001)

IV-4- Composés chimiques présents dans les différentes Propolis:

l'acétatine, l'acide benzoïque, l'acide caféique, l'acide cinnamique, l'acide férulique, l'alcool cinnamique, le chéniphéride, la chrysidé (qui est à l'origine de la couleur jaune de la propolis et de la cire), le diméthoxyflavone (deux variétés), le diméthoxyflavonol, le diméthoxyflavonone, la galangine, l'isovaniline, l'isalpine, le P. coumarate de benzyle, la pectolinarigénine, la pinobanksine, la pinocembnine, la pinostrobine, la quercétine, la rhamnocitrine, la sakuranétine, la tectochrysin et la vanifine.

IV- 5- Activité Biologiques de la Propolis :

Depuis la plus haute antiquité, des préparations à base de propolis ont été utilisées pour leurs propriétés anti-infectieuses, anti-inflammatoires et anesthésiques. Parmi ses principales propriétés scientifiquement prouvées, on peut citer une activité antibactérienne à large spectre antiprotozoaire, un important effet de régénération tissulaire et une activité anesthésique marquée, le tableau ...ci-dessous résume les activités biologiques les plus importantes :

Tableau 7 : Principales activités biologiques de la propolis

Propriétés	Actions	Principales Molecules actives
Antiseptique Anti-bactérienne Anti-fongique Anti-viral	<p>La propolis est une substance aux propriétés antiseptiques prédominantes, étendues à de nombreuses souches de micro-organismes bactériens, de moisissures et de levures.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anti-bactérienne : Elle agit par inhibition de la division cellulaire responsable de l'arrêt de croissance des germes et par désorganisation du cytoplasme, des membranes cytoplasmiques et cellulaires ainsi qu'une inhibition de la synthèse des protéines. Son activité concerne aussi les germes responsables des caries dentaires. • Anti-fongique : Inhibition du développement des différents Candida, Torulopsis, Candida Albicans, Saccharomyces, Cryptococcus... • Anti-viral : La propolis a une activité anti-herpétique et virocyde sur certains virus grippaux, A2 en particulier. 	Flavonoïdes - Chrysrine - Pinocembrine - Galangine
Régénératrice des tissus	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation des processus de régénération 	
Anti-inflammatoire	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation des macrophages • Inhibition de l'agrégation plaquettaire • Inhibition de la synthèse des eicosanoïdes 	Acides Phénols - Acide caféique - Acide férulique
Anesthésique	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la sensibilité cutanée 	
Anti-oxydantes	<ul style="list-style-type: none"> • Effet anti-radicalaire vis-à-vis de différents types de radicaux oxygénés • Activité supérieure à celle des vitamines C et E 	

ETUDE EXPERIMENTALE

- *MATERIEL ET METHODE*
- *RESULTAT ET INTERPRETATION*
- *DISCUSSION*

Matériel et Méthodes

I- Matériels et méthode

I-1-Matériels

I-1-1-matériel biologique et chimique

I-1-1-1- Entretien des animaux

La présente étude a été réalisée sur des souris albinos NMRI dérivée de la souche Suisse provenant de l'institut Pasteur (Alger). Les animaux sont élevés dans des cages de volume 42 x31 x16 cm³ avec la luminosité de 12/24 heures, et maintenue à une température de 21 à 22°C, l'aération est facilitée par deux extracteurs. La nourriture est composée de croquettes (à base de maïs) et d'eau.

I-1-1-2- Préparation de l'extrait hydroalcoolique

L'extrait de la propolis hydroalcoolique utilisé est présente sous forme d'une solution hydroalcoolique à la concentration de 1g/ml en solution mère, à partir de laquelle nous avons préparé une solution fille à administrer par voie orale aux animaux.

I-1-1-3- Le médicament Cyclophosphamide

Le médicament utilisé est un anticancéreux de la classe des moutardes à l'azote : Cyclophosphamide (Famisas®). Ce médicament nous a été offert par le Centre Anti-Cancéreux CAC du CHU Constantine. Il se présente sous forme d'une poudre de 500mg qui a été diluée dans 25 ml d'eau distillée stérile soit une solution de concentration 20mg/ml. La dose administrée de 80 mg /kg de Cyclophosphamide a été effectuée selon le poids corporel de chaque animal (Annexe II).

I-1-1-4- Traitement des Animaux

Les animaux utilisés pour l'étude se répartissent en 3 lots: lot1 témoin, lot 2 et lot 3.

Au 1^{ère} semaine les souris ne subissent aucun traitement, au 2^{ème} semaine les souris de lot 3 subissent un prétraitement par l'extrait de propolis hydroalcoolique les autres souris reçoivent l'eau distillée et au 3^{ème} semaine les souris de chaque lot traité comme suit.

-1^{er} lot : 7 souris témoins ne subissent aucun traitement(reçoivent l'eau distillée).

-2^{ème} lot : 7 souris recevant un médicament anticancéreux Cyclophosphamide à la dose de 80 mg/kg par voie intra-péritonéale.

-3^{ème} lot : 7 souris recevant la solution de propolis «solution hydroalcoolique » comme un prétraitement pendant une semaine et un traitement par une dose unique de Cyclophosphamide à la dose de 80 mg/kg par voie intra-péritonéale.

I-1-2-Matériel de Laboratoire

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

-Tampon phosphate 0,1M. PH=8.

-Solution de DTNB 10mM.

-TCA 5%.

- Tampon TS (PH=7,2 à 4°C)
- Na Cl 0,9%.
- Substrat : L- γ -glutamyl paranitroanilide.
- Tampon tris MgCl₂Ph=9).
- Acide acétique.

I-2-Méthodes :

I-2-1-Sacrifice et dissection des animaux :

Le sacrifice des animaux de chaque lot a été effectué aux jours J3, J7 et J14 après le traitement par l'anticancéreux. Selon les effectifs 2, 3 et 2 respectivement.

La dissection des animaux après leur sacrifice s'est effectuée selon les étapes suivantes :

- ❖ Fixation de l'animal sur le dos à l'aide de 4 épingles enfoncées dans les pattes.
- ❖ A l'aide de la pince et des ciseaux, une boutonnière est incisée dans la peau de l'abdomen, un peu en avant de l'orifice urinaire, en coupant suivant l'axe proximo-distal.
- ❖ La sonde connelée est engagée dans la boutonnière, juste sous la peau, le tégument est ensuite incisé suivant la ligne médiane jusqu'au voisinage de la bouche.

Les reins et les foies prélevés de chaque animale sacrifiée ont été pesés à l'aide d'une balance de précision en vue d'effectuer les analyses enzymatiques et non enzymatiques.

I-2-2-Explorations biochimiques :

I-2-2-1-Extraction des fractions cytosoliques hépatique et rénale:

La fraction cytosolique du foie et du rein est préparée dans des tampons différents selon la mesure ou le dosage réalisé.

Le dosage du glutathion s'effectuant sur le cytosol des hépatocytes et les cellules rénales dont la fraction cytosolique est extraite selon le protocole suivant:

1g de foie ou de rein est broyé dans 3 ml TCA à 5% à l'aide du broyeur de Dounce, l'homogénat ainsi obtenu est divisé en deux tubes à hémolyse puis centrifugé à 2000 trs/min pendant 10 minutes. Le surnageant représente la fraction cytosolique.

Pour la mesure de l'activité de la γ -GT, 1g de foie est broyé dans 3 ml de tampon Tris-MgCl₂. La centrifugation de l'homogénat à 3000-4000 trs/min pendant 15 min aboutit à un surnageant représentant la fraction cytosolique.

La fraction cytosoliques utilisée pour le dosage des protéines hépatiques et rénales s'effectue sur un homogénat préparé dans une solution de KCl à 1,17% puis centrifugé à 800 trs/min pendant 15 minutes à 4°C, le surnageant récupéré est soumis à une deuxième centrifugation à 9600 trs/min pendant 45 minutes à 4 °C, le deuxième surnageant est la fraction cytosolique.

I-2-2-2-Récupération des urines :

La récupération des urines s'effectue après la mise des souris de chaque lot dans des cages à métabolisme pendant 24h. Les urines ainsi récupérées sont centrifugées à 3000 trs/min pendant 15 minutes le surnageant est dilué au 1/10^{ème} pour la mesure enzymatique.

I-2-3- Dosages et mesures des activités enzymatiques :

I-2-3-1- Dosage du glutathion cytosolique :

Le glutathion est dosé quantitativement dans les fractions cytosoliques hépatiques et rénales par la méthode colorimétrique utilisant le réactif d'Ellman (DTNB). La réaction non enzymatique consiste à couper la molécule d'acide 5,5' ditiobis 2 nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH et en la libération d'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à la PH 8-9 présente une absorbance maximale à 412nm (Ellman, 1959).

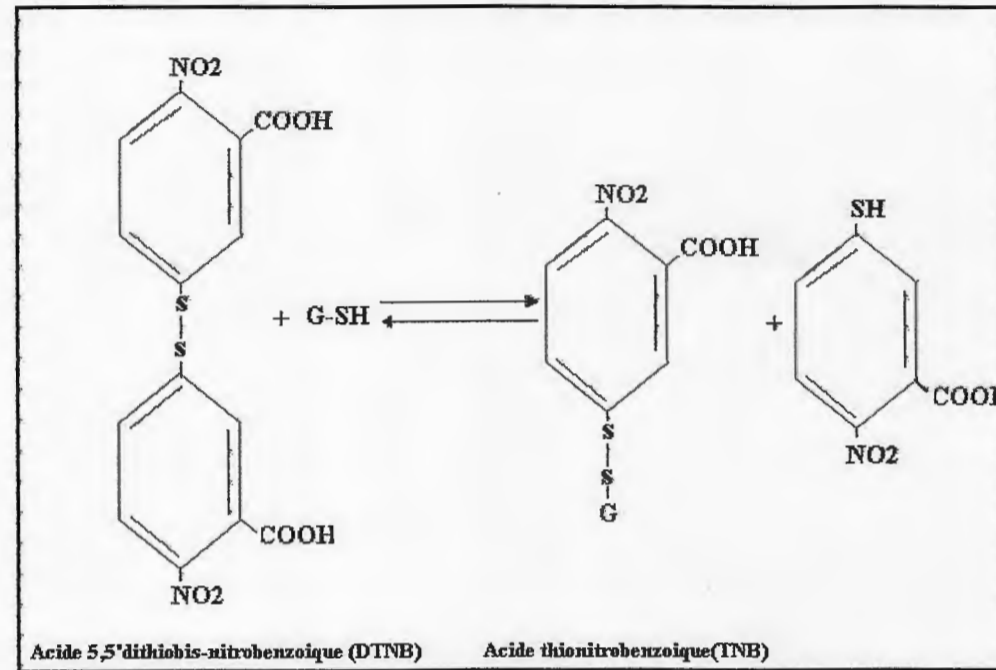


Figure12 : La libération de TNB à partir de DTNB par la molécule de GSH

On prépare un mélange réactionnelle contient 50 μ l de fraction cytosolique et 10ml de Tampon phosphate.
3ml de cette solution est additionné à 20 μ l de DTNB (tableau 2).

Tableau 8: Préparation de la solution 1 de mesure

Fraction cytosolique	50 μ l
Tampon phosphate	10ml

Tableau 9 : Dosage du glutathion

essai	S1	3ml
	DTNB	20ml
blanc	TCA	3ml
	DTNB	20µl

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

I-2-3-2-Dosage des protéines cytosoliques du foie :

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry (Lowry et al., 1953) avant les mesures des activités enzymatiques à partir de la fraction cytosolique extraite dans le KCl, le dosage se fait selon la méthode de Lowry.

La détermination du taux de protéines cytosoliques nécessite la préparation d'un mélange réactionnel (tableau 3) :

On ajoute 50µl de fraction cytosolique à 45µl de tampon phosphate, Le mélange réactionnel préparé est utilisé pour le dosage des protéines.

5 µl de mélange réactionnel est ajouté à 1,98 µl de Na Cl (0,9%).

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

Tableau 10: Composition du mélange réactionnel.

Réactif	Volume
Fraction cytosolique	50µl
Tampon TS	45µl

Tableau 11: Dosage des protéines cytosoliques

ESSAI	Mélange réactionnel	5µl
	Na Cl 0,9%	1,98µl
BLANC	Tampon TS	20µl
	Na Cl 0.9%	1.98µl

-le dosage de la concentration des protéines cytosolique est calculé selon la formule :

$$\frac{DO_{MOYENNE} \times 1000}{0.0096} \times \frac{1}{1000} = [] \text{ mg/ml} \quad (\text{Lowry et al., 1953})$$

I-2-3-3-Activité de la γ-Glutamyl Transpeptidase :

L'activité de la GGT a été réalisée en utilisant le L-γ-glutamyl paranitroanilide comme substrat selon la méthode de Meister (Meister et al., 1981)

On ajoute 200µl de solution de l- γ-glutamyl paranitroanilide, 100µl Tampon Tris-MgCl₂ de à 50µl de fraction cytosolique, puis complète le volume à 1000µl par l'eau distillée.

Tableau 12: Activité de γ-GT

ESSAI	Fraction cytosolique	50µl
	l- γ-glutamyl paranitroanilide	200 µl
	Tampon Tris-MgCl ₂	100 µl
	H ₂ O	650 µl

Après incubation du mélange à 25°C pendant 30 min, 1ml d'acide acétique est ajouté. La lecture de la DO à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant la fraction cytosolique par de l'eau distillée.

Activité de la :

$$\gamma\text{-GT (UI)} = (\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{blanc}}) \times 0.0602 \times 2\text{ml. (Meister et al., 1981)}$$

II -Résultats et Interprétations

Le suivie de l'étude expérimentale sur les trois lots de souris utilisées pour l'évaluation de l'effet du médicament anticancéreux cyclophosphamide seul et en présence de l'extrait de Propolis a été dirigé selon les paramètres suivants :

II-1- Variations des poids des animaux

La surveillance des souris a été effectuée quotidiennement au cours des quatre semaines d'étude. Les résultats des pesées sont répertoriés dans le tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13 : Poids des souris des trois lots chaque semaine (g)

	Semaine 1	Semaine2	Semaine3	Semaine4
Lot1(témoin)	33,58±0,82	33,45±0,99	33,84±0,42	33,24±1,55
Lot2(traité par cyclophosphamide)	29,89±0,11	30,29±0,3	30,27±0,41	28,31±0,68
Lot3(traité par cyclo+propolis)	30,14±0,48	30,13±0,91	29,24±0,76	31,13±0,54

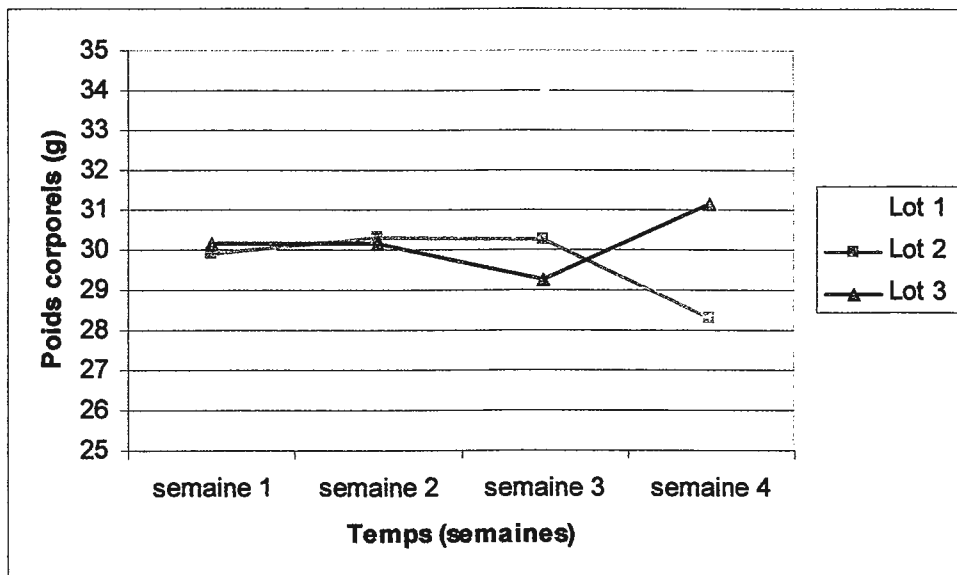


Figure 13: Variations des poids corporels des animaux.

La figure 13 indique l'évolution des poids des animaux au cours des quatre semaines de l'étude. Le lot traité par le cyclophosphamide (lot 2) et prétraité par la propolis (lot 3) montrent une différence à partir de la troisième semaine soit au début du traitement par le médicament anticancéreux à savoir augmentation chez le lot 3 et une diminution chez le lot 2.

II-2- Rapport des poids des organes /poids des animaux :

II-2-1 Rapport des poids des foies /poids des animaux :

Le tableau 14 expose la relation entre les poids des foies prélevés par rapport au poids corporels.

Tableau 14: Rapport des poids des foies /poids des animaux

Les jours	Lot1(témoin)	Lot2(cyclophosphamide)	Lot3(cyclo+propolis)
3 ^{ème} jour	0,056	0,066	0,051
7 ^{ème} jour	0,065	0,060	0,051
14 ^{ème} jour	0,060	0,052	0,056

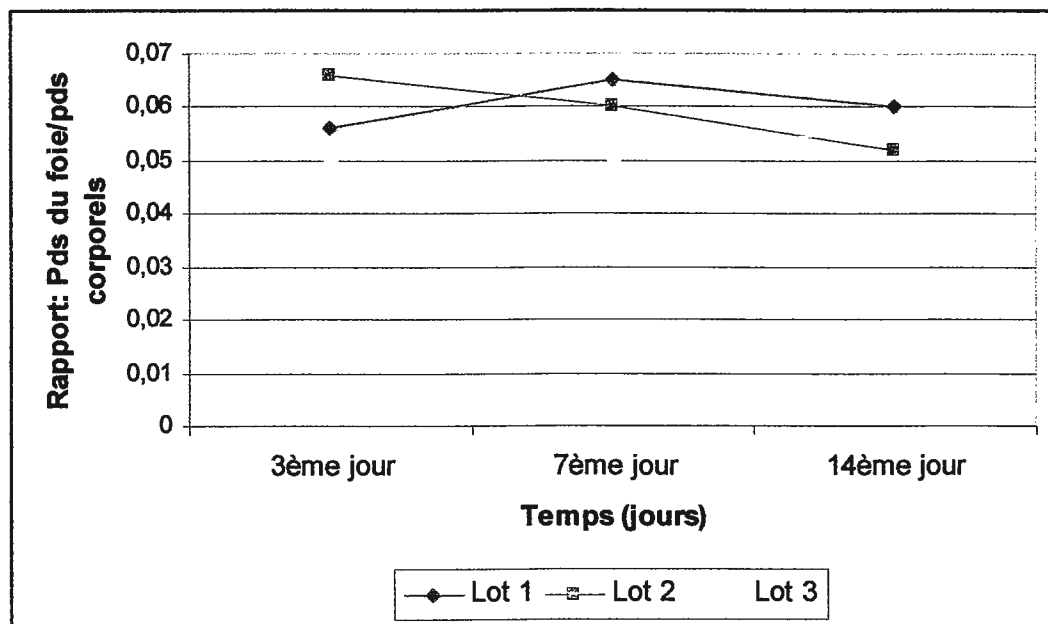


Figure 14: Rapports des poids des foies et les poids corporels pour chaque lot Au cours de l'étude

La figure 14 ci-dessus montre la différence entre les rapports des poids des foies et poids corporels pour chaque sacrifice.

La comparaison entre les poids des foies par rapport aux poids corporels entre les lots témoins et traités ne montre pas de différences significatives, le test ANOVA à un seul facteur a donné une valeur critique supérieure à la valeur calculée.

II-2-2-Rapport des poids des reins /poids des animaux :

Le tableau 15 expose la relation entre les poids des reins prélevés par rapport au poids corporels.

Tableau 15 : Rapport des poids des reins / poids des animaux.

Les jours	Lot1(témoin)	Lot2(cyclophosphamide)	Lot3(cyclo+propolis)
3 ^{ème} jour	0,0058	0,0052	0,0058
7 ^{ème} jour	0,0059	0,0064	0,0059
14 ^{ème} jour	0,0058	0,0054	0,0056

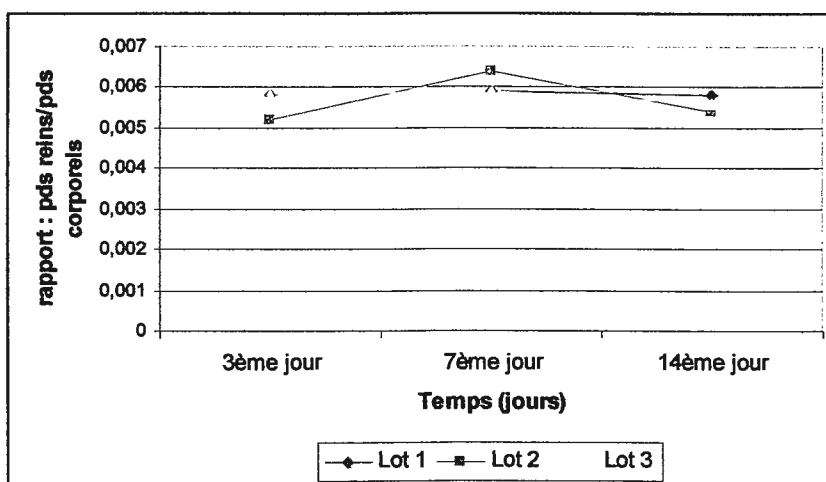


Figure 15 : Rapports des poids des reins et les poids corporels pour chaque lot au cours de l'étude

La figure 15 ci-dessus montre la différence entre les rapports des poids des reins et poids corporels pour chaque sacrifice. La comparaison entre ces poids par rapport aux poids corporels entre les lots témoins et traités ne montre pas de différences significatives, le test ANOVA à un seul facteur a donné une valeur critique supérieur à la valeur calculée.

II-3-Dosage du glutathion cytosolique :

II-3-1- Courbe d'étalonnage du GSH :

Le dosage du glutathion a été déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage (figure16) réalisée selon les résultats listés dans le tableau 10ci-dessous.

Tableau 16: Résultats des DO de la courbe d'étalonnage de GSH.

[GSH](mM)	0	0,312	0,625	1,25	2,5	5	10	20
DO	0	0,129	0,142	0,163	0,204	0,343	0,711	1,35

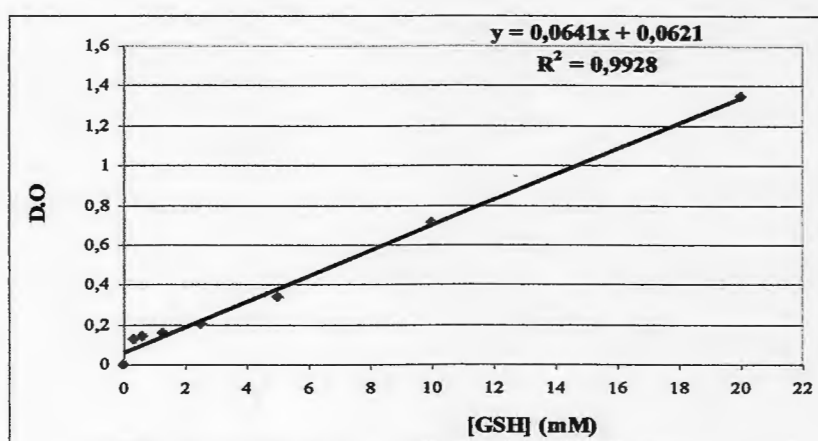


Figure 16 : Courbe d'étalonnage du GSH

II-3-2-Dosage du glutathion :

II-3-2-1-Résultats du dosage du glutathion à partir de la fraction cytosolique hépatique :

Les résultats du dosage du glutathion d'après la courbe d'étalonnage sont réunis dans le tableau 17 ci-dessous.

Tableau 17 : Résultats du dosage du glutathion hépatique (mM/ 1g de tissu)

	3 ^{ème} Jour	7 ^{ème} Jour	14 ^{ème} Jour
Lot1(témoin)	5,96± 3,31	10,69± 3,31	8,32± 3,31
Lot2(cyclophosphamide)	20,54± 12,32	11,18± 6,35	17,95± 6,08
Lot2(cyclo+propolis)	6,43± 4,87	5,36± 3,39	4,6± 5,61

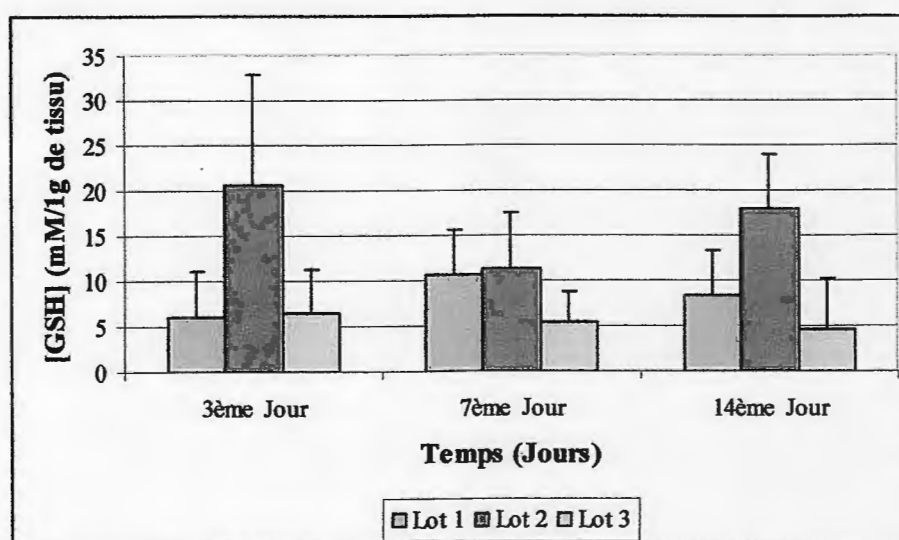


Figure 17 : Variations des taux de GSH hépatique entre les lots 1, 2 et 3 au cours de l'étude

La figure 17 ci-dessus montre les variations des concentrations hépatiques de Glutathion chez les souris des lots 1, 2 et 3 au cours de l'étude expérimentale.

Après 3 jours de traitement, une augmentation d'environ 244% est observée chez les souris du 2^{ème} lot. Contre une légère augmentation (7,88%) pour le 3^{ème} lot par rapport au témoin.

Après 7 jours de traitement on n'observe pas de variations pour le taux de GSH entre les témoins et traités par le Cyclophosphamide, par contre une nette diminution d'environ 49,86% de ce taux est observée pour le lot prétraité par la propolis.

Au 3^{ème} sacrifice réalisé, après 14 jours du traitement; les dosages du GSH hépatique ont montré une augmentation de 115,74% chez le lot 02. Et une franche diminution de 44,72% par rapport au témoin.

Nous avons donc observé des augmentation des concentration de GSH chez les souris du lot 02 à 3 et 14 jours après traitement par une dose unique de cyclophosphamide (80mg/kg) et une diminution chez les lots 2 et 3 par rapport au témoin.

II-3-2-2-Résultats du dosage du glutathion à partir de la fraction cytosolique rénale :

Le tableau 18 ci-dessous expose les résultats du dosage du glutathion cytosoliques rénal d'après la courbe d'étalonnage citée ci-dessus :

Tableau 18: Résultats du dosage du glutathion rénal (mM/1g de tissu)

	3 ^{ème} Jour	7 ^{ème} Jour	14 ^{ème} Jour
Lot1(témoin)	4,66± 3,43	9,63±3,43	7,14±3,43
Lot2(cyclophosphamide)	9,43±6,75	5,97±6,22	5,09±0,61
Lot2(cyclo+propolis)	5,35±1,87	11,14±0,98	9,52±5,64

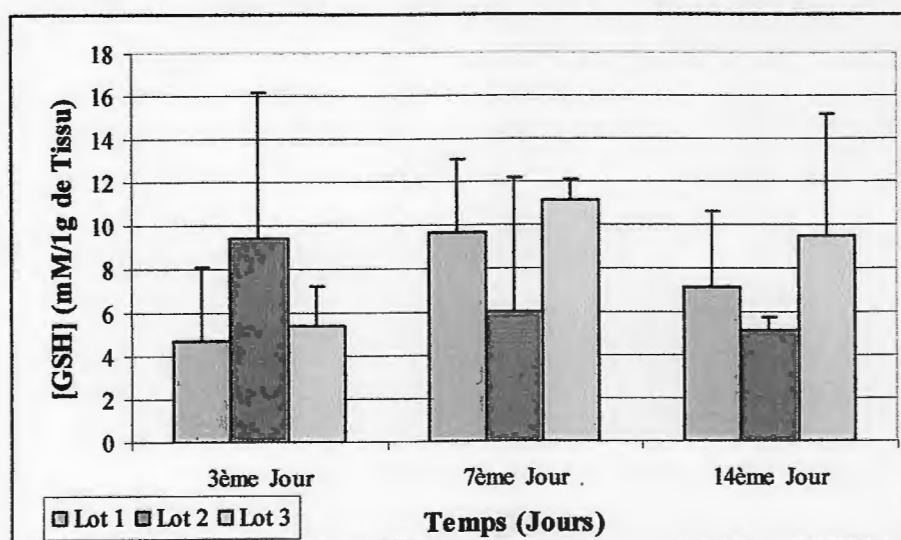


Figure 18: Variations des taux de GSH rénal entre les lots 1, 2 et 3 au cours de l'étude

La figure 8 ci-contre montre les variations des concentrations de GSH rénaux chez les souris traitées et les témoins.

Après trois jours de traitement, il y a une augmentation de 102,36 %, chez les souris du lot 2 ainsi qu'une élévation de 14,80% chez les souris du lot 3 par rapport aux témoins.

Au 7^{ème} jour après le traitement, il y a une diminution de 38% du taux de glutathion rénal contre une augmentation de 15,68% chez le lot 3 par rapport aux témoins.

Au 14^{ème} jour après le traitement; Nous avons observé une diminution du GSH d'environ 28,72% chez le lot traité, par contre un accroissement de ce taux de 33,33% par rapport aux témoins.

II-4-Mesure de l'activité de la Gamma-Glutamyl Transpeptidase (γ -GT)

II-4-1- Mesure de l'activité de la γ -GT cytosolique du foie :

L'activité de la γ -GT cytosolique a été effectuée sur la fraction cytosolique hépatocytaire. Les résultats obtenus sont classés dans le tableau 19 suivant :

Tableau 19 : Résultats de l'activité enzymatique de la γ -GT cytosolique hépatique (UI/mg de Protéine)

	3 ^{ème}	7 ^{ème}	14 ^{ème}
Lot1(témoin)	0,0054	0,0047	0,005
Lot2(cyclophosphamide)	0,0045	0,0067	0,0021
Lot2(cyclo+propolis)	0,0039	0,0039	0,00206

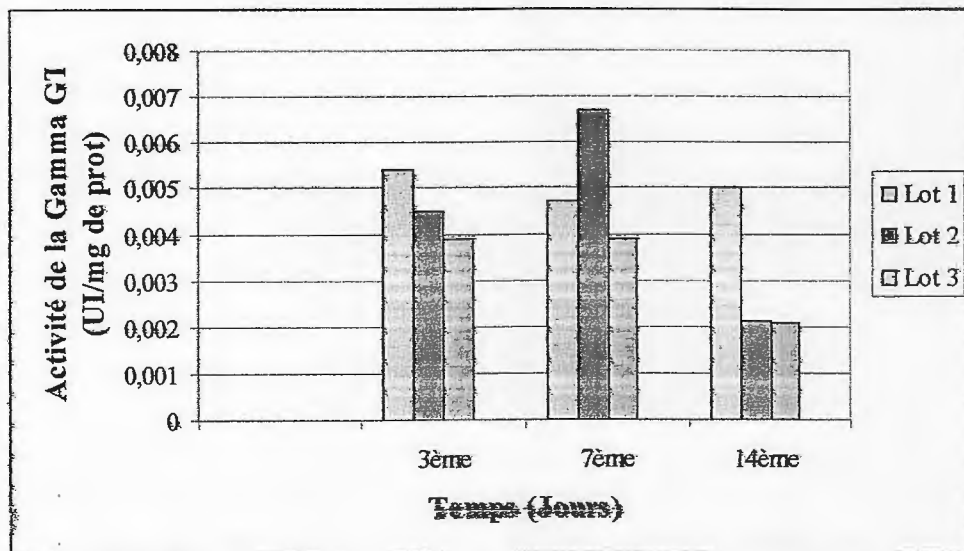


Figure 19: Les variations de l'activité enzymatique de la γ -GT chez les animaux témoin et traité.

La figure 19 montre les variations de l'activité enzymatique de la γ - GT chez les lots témoin et traitée.

Après 3 jours de traitement, une diminution de cette activité est relevée chez les animaux du lot 2 par 16,67% et 27,1% chez lot 3 par rapport au lot témoin.

7 jours après le traitement, nous avons obtenus une augmentation d'environ 42,55% de cette activité chez le lot 2 contre une diminution (17,1%) chez le lot 3 par rapport au témoin.

Au 14^{ème} jour, une diminution considérable estimée à 58 % est soulevée chez le 2^{ème} lot et 59 % chez le 3^{ème} lot par rapport au témoin qui conserve presque la même activité.

II-4-2-Activité de la γ -GT urinaire:

La mesure de l'activité de la γ -GT urinaire a été effectuée sur les urines de 24heurs des souris de chaque lot avant et après le traitement. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 20 ci-dessous :

Tableau 13: Résultats de l'activité enzymatique de la γ -GT urinaire (UI)

	Lot1(témoin)	Lot2(cyclophosphamide)	Lot3(cyclo+propolis)
avant le traitement par Cyclophosphamide	0,056	0,048	0,137
après le traitement par Cyclophosphamide	/	0,082	0,085

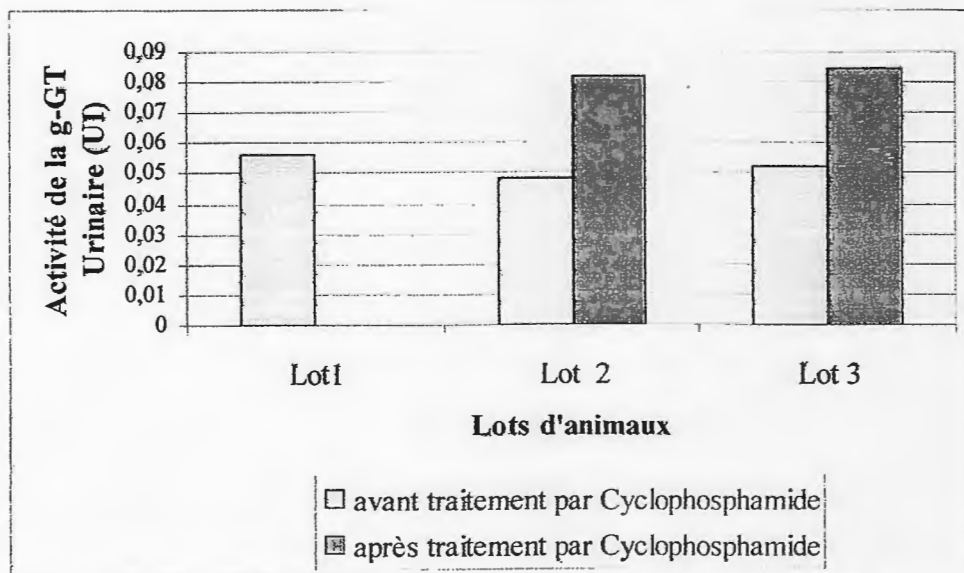


Figure 20 : Variations de l'activité de la γ -GT chez les animaux de chaque lot avant et après le traitement.

Les résultats affichés dans la figure 20 montrent la variation de l'activité enzymatique de γ - GT chez les souris des lots 1,2et 3 avant et après le traitement.

Le lot 2 a montré des variations notables concernant l'activité de la γ - GT urinaire avant et après le traitement par le cyclophosphamide, en effet, la mesure de cette activité après le traitement est plus élevée de 170,83% par rapport à sa mesure avant le traitement.

Discussion

Discussion :

L'étude de l'effet de propolis au cours d'un traitement par un anticancéreux à été réalisé sur des souris réparties en trois lots chacun contenant 7 souris :

Un lot témoin; un lot traité par le médicament cyclophosphamide (anticancéreux) a la dose 80mg/kg et un lot traité par une association de cyclophosphamide et l'extrait de propolis (diosmine et que cétine), ce dernier est donné par voie orale à la dose quotidienne de 100mg/kg pendant 7 jours avant le traitement par cyclophosphamide, qui est donné un seul dose unique de 80mg/kg, il est administré par voie intraperitonéale.

Sur notre étude, nous avons évalué l'effet de cyclophosphamide (anticancéreux) en présence et en absence de propolis sur l'activité de certains paramètres hépatiques et rénal qui sont le GSH du foie et de rein.

Nous avons programmé des sacrifices des animaux à un intervalle de 3,7; 14 jour après le traitement par cyclophosphamide nous n'observons aucune mortalité de des animaux car la dose à administrer est thérapeutique. Qui moins de DL50.

Les souris de différents lots ont été pesé quotidiennement avant et après le traitement (Tableau 6), les moyennes des poids corporels des souris dans chaque lots (tableau 6, figure 2) montrent une stabilité de croissance de lot témoin par contre à les lots traités. Le lot 2 traité par le cyclophosphamide seul montre une diminution du poids corporelle lors de la 3^{ème} semaine mais au contraire pour le 3^{ème} lot traité par propolis connaître une augmentation de poids lors de la 3^{ème} semaine.

Cette constatation est confirmée par une anorexie chez les souris de lot 2 par rapport au témoin qui gardent un appétit normal, cela s'exprime l'effet des métabolites secondaire de cyclophosphamide, contraire pour le lot 3 il y a une augmentation de l'appétit grâce à l'effet préventif de propolis contre les substances néfastes pour les cellules.

La surveillance des poids des animaux reflètent les pesés hebdomadaires avant chaque sacrifice du poids corporel, le rein et le foie après la sacrifice, ainsi que les rapports établie entre les poids corporel et les reins, les poids corporel et les foie. Les résultats révèlent des variations de ces rapports s'agissent d'une augmentation de volumes foie du 3^{ème} lot causé par l'effet de propolis au contraire pour le 2^{ème} lot qui diminué par rapport au témoin à cause de l'effet toxique du métabolites par rapport au témoin à cause de l'effet toxique du métabolites réactif du cyclophosphamide, dans ce cas sont: les moutarde phosphamide et l'caroline (Lahouel, 2004).

L'exploration de l'effet de propolis associée au cyclophosphamide Chez les animaux témoins et traité s'est limitée à des mesure d'activité enzymatique/Le GSH cytosolique du foie et du rein.

Des études montrent que le cyclophosphamide transformé dans le foie par P450. Les métabolites réactifs ainsi formés sont responsables d'une glutathion et d'une lipoperoxydation hépatocytaire. Par ailleurs le propolis est une substance polyphénolique d'origine végétale ayant des propriétés biologiques antioxydantes (Lahouel, 2004).

Les résultats de dosage des protéines cytosoliques (Tableau 9 figure 5) montrent une nette augmentation chez les animaux traités expliquant d'une production enzymatique due à la présence. Des métabolites peuvent s'agir de substances éventuelles, et après il y a une diminution expliquée par l'élimination des métabolites, donc moins de substrat cause à moins d'activité.

Dans notre étude montre que le taux de glutathion est augmenté après l'administration de médicament anticancéreux s'exprime dans le résultat de dosage en 3^{ème} jours après le sacrifice. L'augmentation de concentration cellulaire de glutathion ont été associées à la résistance à différents agents anticancéreux cette augmentation due à l'effet de métabolite (Gallagher et al., 1998).

La diminution de taux de glutathion (proche de témoin) s'explique par le retour physiologique normal d'animaux. Le glutathion permet la détoxification des radicaux libres et le neutralise (Gutman et Shitini, 1993). Le 14 jour après le traitement le taux de glutathion est augmenté c'est le cas de stress.

Les résultats de dosage de γ -GT hépatique montre que l'activité γ -GT est augmentée après le traitement par les anticancéreux donc il y a une induction de l'activité de cette enzyme. À la présence de cet agent et encore en parallèle de la diminution de taux de GSH. Il y a une relation entre le GSH et cette enzyme.

Hanigan et Pitot suggèrent que γ -GT qui cliver. Le GSH intracellulaire a des aminoacides (cystéine, glycine et acide glutamique) est positive pour les hépatocytes qui mieux capable de maintenir des niveaux de GSH intracellulaire, mais est négative lorsque l'animal est soumis à un traitement par les agents déplétifs (anticancéreux) de glutathion intracellulaire. Ainsi au blocage de glutathion synthétase par les (anticancéreux) (Gallagher et al., 1998).

Les résultats de dosage de glutathion urinaire montre que, l'activité de γ -GT urinaire qui devient de γ -GT sériques est augmentée après le traitement par le cyclophosphamide est augmentée à la même valeur pour les lots 1 et 2 soit présence ou absence de GSH, cela s'explique que le propolis n'a pas un effet sur cette enzyme. Mais avant le traitement l'activité de γ -GT des souris de lot 3 est augmentée, cela due à la physiologie des souris.

Des études déjà montrées que le rein et le contient l'enzyme qui catalyse la synthèse et l'utilisation de glutathion, ces réactions impliquent dans le cycle γ -glutamyle.

Conclusion

Conclusion

La chimiothérapie anticancéreuse a pour but d'éliminer les cellules cancéreuses dans l'ensemble des tissus.

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

Les pré- traitements par la propolis permet d'atténuer la toxicité du cyclophosphamide, le mécanisme par lequel les flavonoides exercent leurs effets antitoxiques serait lié à la captation des radicaux libres responsables de la toxicité.

L'étude de l'effet induite par l'administration de cyclophosphamide chez la souris albinos NMRI a conduit aux résultats suivants:

- Une augmentation de l'activité enzymatique de la γ -GT en parallèle une diminution de taux de GSH après le traitement par le cyclophosphamide.
- L'augmentation de taux de glutathion en absence de propolis et la diminution en présence de propolis au cours de traitement.

Références Bibliographiques

REFERENCES

- Allain P. (2006). Extrait des médicaments. 3^{ème} édition.
- Aslund F, Berndt RD & Holmgren H. (1997). *J. Biol Chem.* Dec 5. **272(49)**: 30780-6.
- Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique (AFECT). (2003). Médicament antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers. **6**: 380-399.
- Bankova V, Popova M, Bogdanov S & Sabatinic AG. (2002). Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Z. Naturforsch.* **57c**: 530-533.
- Becouarn Y. (1993). Cancérologie et hématologie. **8**: 41-65. Dans le mémoire DES «Variation de l'activité de la SOD, catalase et glutathion au cours du traitement par les anticancéreux ». Promotion (2006). Université de jijel.
- Benguedouar L, Boussenane HN, Kebsa W, Alyane A, Rouibah H & Lahouel M. (2008). Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin). *Indian Journal of Experimental Biology.*
- Benzi G, Pastoris O, Mazatico F & Villa RF. (1988). Influence of aging and drug treatment on the cerebellar glutathione system. *Neurobiol. Aging.* **9**: 371-375. In article: Gupta A, Gupta M, Datta M & Shukla GS.(2000). Cerebral antioxidant status and free radical generation following glutathione depletion and subsequent recovery. *Molecular and Cellular Biochemistry.* **209**: 55-61.
- Berman A J. (1999). Supporting the home care provid. **4(2)** : 7-81.
- Burdock GA. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis, *Food Chem. Toxicol.* **36**: 347-363.
- Clu F & Lurgue G. (1992). Toxicologie. 2^{ème} édition. P: 1292.
- Comhair SA & Erzurum SC. (2002). Antioxydant reponses to oxidant-mediated lung diseases. *AM. J. physcol.* **283**: 246- 25
- Delattre J, Durand G & Jardillier JC. (2003). Biochimie pathologie. P: 687.
- Demers J P. (1999). Les radicaux libres, question d'équilibre. Édition Demers. Paris, p :2.
- Devulser B. (1998). Pathologie médicale. Paris, Masson collection « Abrégés de médecine ».
- Donadiou Y. (2000). "LA PROPOLIS" (Maloine Editeur) de la Faculté de Médecine de Paris.
- Ellman G. (1959). Plasma antioxidants. *Arch biochem biophys.* **82**: 70-77.

- Groscurth P, Fleming N & Kistler GS. (1977). The Activity and Distribution of Gamma-Glutamyl Transpeptidase (γ -GT) in Human Lung Cancers Serially Transplanted in Nude Mice. *Histochemistry*. **53**: 135- 142.
- Gutman J & Shittini S. (1993). F.A.C.E.P Le guide ultime du glutathion.
- Habdous M, Siest G, Herbeth B, Vincent- Viry M & Visvikis S. (2004). Polymorphisms des glutathione S-transferase et pathologies humanness: bilan des etudes epidemiologiques. **62**:15-24.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. (1999). Free radicals in biology and medicine. Oxford Science Publications, Oxford.
- Husby NE. (1977). Purification and some properties of gamma glutamyl trasférase from human liver. *biochimi. biophys act*. **483**:46-56.
- Jacotot B & Leparco J. (1989). Nutrition et alimentation. 2^{ème} edition. Masson paris. P15-20.
- Karleskind A. (1992). Manuel des corps gras. *ISBN. Paris*. P: 572-573.
- Lahouel M, Boulkour S, Segueni N & Fillastre JP. (2004). Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentaion du glutathion hépatique. *Pathologie Biologie*. **52**: 314-322.
- Laperche Y. (1989). La gamma glutamyl-transpeptidase hépatique. *Gastroenterol clin. Biol*. **13** : 783-90.
- Lepicard A, Mallat A, Zafrani ES & Dhumeaux D. (1994). Atteinte chronique des canaux biliaire inter lobulaires induite par le fénobrate. *Gastroenterol clin. Biol*. **18** :1033-5.
- Lechat P, Calvo F, Giroud J, Rouveiw B & Weber S.(1990). Pharmacologie médicale. 5^{ème} édition. P: 244-248.
- Lieberman MW, Barrios R, Carter BZ, Habib GM, Habib M, Lepovitz RM & Rajogopalan S et al. (1995). Gamma glutamyl transpeptidase. *AMJ. Pathol*. **147**: 1175-85.
- Lodish B, Berk Z & Matsudaira D. (1995). Biologie moléculaire de la cellule. 3^{me} édition. P: 664.
- Louisot P. (1989). Biochimie générale et médicale. P: 26.
- Lowry O, Resenbrangh N, Farr L & Ronald R. (1953). Protein meseasurement, with the folin pherol reagent. *J. Biol. Chem*.**183**: 265-275.
- Marchenay P. (1977) .La propolis. (Chez l'auteur, 57, rue Cuvier, 75231 - Paris Cédex 05). Ce travail comporte une abondante bibliographie de référence.

- Lieberman MW, Barrios R, Carter BZ, Habib GM, Habib M, Lepovitz RM & Rajogopalan S et al. (1995). Gamma glutamyl transpeptidase. *AMJ. Pathol.* **147**: 1175-85.
- Lodish B, Berk Z & Matsudaira D. (1995). Biologie moléculaire de la cellule. 3^{me} édition. P: 664.
- Louisot P. (1989). Biochimie générale et médicale. P: 26.
- Lowry O, Resenbrangh N, Farr L & Ronald R. (1953). Protein meseasurement, with the folin pherol reagent. *J. Biol. Chem.* **183**: 265-275.
- Marchenay P. (1977) .La propolis. (Chez l'auteur, 57, rue Cuvier, 75231 - Paris Cédex 05). Ce travail comporte une abondante bibliographie de référence.
- Meister A. (1994). Glutathione- ascorbic acid antioxidant system in animals. *Journal of biological chemistry.* **269**: 397-400.
- Meister A & Tate SS. (1976). Glutathione and related gamma -glutamyl compounds biosynthesis and utilisation. *Rev biochem.* **4**: 739-42.
- Meister A, Tate SS And Griffith OW. (1981). γ -Glutamyl Transpeptidase. *Meth. Enzymol.* **77**: 273-253. In: dringen R, Kranich O and Hanprecht B. (1997): The γ -Glutamyl transpeptidase inhibitor avtivicin preserves glutathione released by astroglial cells in cultur *Neurochemical research.* **22**: 727-733.
- Morin Y et al. (2002). Larousse médical. Edition larousse. P: 437.
- Moulin M & Coquerel A. (1998). Pharmacologie. 2^{ème} édition. P: 415-418.
- Moussard C. (2006). Biochimie structurale et métabolique. 3^{ème} édition. P: 335-340.
- Moussavian SN, Becker RC, Piepmeyer JL, Mezey E & Bozian RC. (1985). Serum Gamma- glutamyl transpeptidase and chronic alcoholism: Influence of alcohol ingestion and liver disease. *Dig Dis sci.* **20**: 11-4.
- Nilssen O, Helge.Ford O & Brenn T. (1990). Distribution and population determinants of gamma-glutamyl transferase *Am. J. Epidemiol.* **132** :318-26
- O'Brien ML & Tew KD. (1996). Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Europ. J. cancer.* **30A**:967-978.
- Orlowski M & Meister A. (1970).The Gamma-Glutamyl Cycle: A possible Transport system for Amino Acid. *Proceedings of the national Academy of sciences.* **67**: 1248-1255
- Penninckx MJ. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research.* **2**: 295-305.
- Pincemail J. (2004). Le stress oxydant. P: 8-9-11.

- Propavko SA. Composition chimique de la propolis, son origine et le problème de la standardisation.
- Reichl FX, Kreppel H, Leibl B, Muckter H, Szinicz L, Benecke JM, Eckert K, Erber B, Golly I & Zilker T. (2004). Guide pratique de toxicologie. 1^{ère} édition P: 140-143.
- Robinson D & Whitehead TP. (1989). Effect of body mass and other factors on serum liver enzyme level in men attending for well population screening. *Ann Clin. Biochem.* **26** : 393-400.
- Sawaya ACHF, Kirillian S, Souza, Marcucci CM, Cunha IBS; Shimizu M T.(2004). Analysis of the composition of brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology.* **35**:104-109.
- Schiele F, Guilmin AM, Detienne H & Siest G. (1977). Gamma-glutamyl-transferase activity in plasma: statistical distributions, individual variations and reference intervals. *Clin. chem.* **23**: 1023-8.
- Schorderet M. (1989). Pharmacologie. Édition Slatkine Genève. P: 821-822.
- Servais S. (2004). Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'azone: effets de l'âge et d'une supplémentation en OMEGA -3. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1. P: 29.
- Sevenet T. (1994). Plantes molécules et médicaments. *Nathom CNRS édition*: 168-170.
- Slater TF. (1972). Free radical mechanism in tissue injury. Pion, London in article: Gupta A, Gupta M, Datta M & Shukla GS.(2000). Cerebral antioxidant status and free radical generation following glutathione depletion and subsequent recovery . *Molecular and Cellular Biochemistry.* **209**: 55-61.
- Smith AC & Boyd M R. (1984). Preferential effects of 1, 3-bis(2chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) on pulmonary glutathione reductase and glutathione disulfidratios: possible implications for lung toxicity. *Journal of pharmacology and experimental therapeutic.* **229**: 658-663.
- Sorkun K, Süer B, Salih B. (2001). Determination of chemical composition of Turkish propolis. *Z. Naturforsch*: **56c**. 666-668.
- Stryer L, Berg JM & Tymolzko J. (2003). Biochimie. 5^{ème} édition. P: 686.
- Sundberg A, Appelkvist EL , Bacman L & Dallner G.(1994).Quantitation of glutathione transférase π in the urine radioimmunoassay.*Nephron.***66**:162-169
- Talbert M & Willoquet G. (2004). Guide pharmaco. Edition lamarre. P: 245-250.
- Tamborini A. (1997). Actualité en cancérologie gyné cologique et maniane poris. ESKA.(2^{ème} cycle d'étude scientifique, medicales et phormaceutique).

- Touitou Y. (1997). Pharmacologie. 8^{ème} édition. P: 331-332.
- Van Bladeren PJ. (2000). Glutathione conjugation as a bio activation reaction. *Chem. boils Interact.* **129**: 61-76.
- Van Kuijk FJG, Sevanian A, Handelman GJ & Dratz EA. (1987). Trends in biochemical sciences. **12**: 31-34.
- Vitoux D, Chapuis P, Arnaud J, BostM, Accominotti M & Roussel AM. Sélinium, glutathion peroxydase, peroxydes et fonctions plaquettaires. *Ann Biol Clin.* **54**: 181-187.
- Voet D G. (1998). Biochimie. P: 810-840.
- Wannamethee G, Ebrahim S & Shaper AG. (1995). Gamma-glutamyl-transferase: determinants and association with mortality from ischemic heart disease and al causes. *Am. J. Epidemiol.* **142**: 699-708.
- Weil J. (2005). Biochimie générale .Ed. Masson. Paris. P: 25- 232-233.
- Zhang H, Forman HJ, Choi J. (2005). Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods Enzymol.* **401**:468-83

Glossaire

-Précancéreux: c'est une lésion susceptible de se transformer éventuellement en cancer, surtout si elle n'est pas traitée de manière adéquate.

-Cholestérolémie: Augmentation anormale du cholestérol (taux du cholestérol dans le sang).

-Xénobiotiques: toute substance étrangère à l'organisme vivant.

-Carcinogènes: toute substance susceptible de favoriser ou de provoquer le développement d'un cancer ou d'une lésion pouvant constituer le point de départ d'un cancer.

-Médullaire: caractérise certains néoplasmes épithéliaux d'architecture solide.

-Glomérulonéphrites: Définie histologiquement par un processus diffus de prolifération glomérulaire extra capillaire, et cliniquement par une évolution rapide vers la mort par insuffisance rénale en quelques semaines ou quelques mois.

-Lymphome non hodgkin : Lymphome appartenant à un groupe hétérogène de lésions cancéreuses caractérisées par l'absence de cellules de Sternberg.

- Maladie de Hodgkin: Dans laquelle on observe une diffusion des cellules cancéreuses dans les noeuds lymphoïdes situés en périphérie de la tumeur originelle et une diffusion extra nodulaire dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses.

-Alopécie : Chute temporaire ou définitive, totale ou partielle, des cheveux ou des poils, qui est due à l'âge, à des facteurs génétiques ou qui fait suite à une affection locale ou générale.

-Athérosclérose: l'épaississement de la paroi des grosses artères (aorte abdominale, coronaires, artères cérébrales, artères de jambes) et leur obstruction par des plaques d'athérome.

-Maladie de Parkinson: c'est l'une des maladies neurodégénératives les plus répandues. Elle se traduit par une destruction lente et progressive des neurones de la substance noire du cerveau.

-Maladie d'Alzheimer: c'est une démence neurodégénérative à prédominance corticale qui touche en premier lieu les fonctions cognitives et se répercute sur le comportement et l'adaptation sociale des patients.

-Antioxydant: Substance naturelle ou chimique destinée à ralentir la dégradation des molécules due aux effets de l'oxydation.

-Chimiothérapie: Administration d'un produit chimique afin de guérir une maladie ou d'entraver sa progression.

Annexes

Annexe I : Les doses administrées de cyclophosphamide selon le poids de chaque souris :

Lot 3	Poids(g)	Doses (ml)
1	28.51	0.114
2	34.19	0.136
3	29.50	0.118
4	34.42	0.137
5	30.05	0.120
6	27.17	0.108
7	30.15	0.120
1	29.84	0.119
2	29.25	0.117
3	29.09	0.116
4	30.07	0.120
5	29.23	0.116
6	30.46	0.121
7	33.84	0.135

Annexe II : Mesures des poids des souris :

Lots	Souris	Semaine1	Semaine2	Semaine3	Semaine4
1	1	36.85 ± 0.026	36.40 ± 3.81	/	/
	2	36.39 ± 0.12	36.91 ± 0.51	/	/
	3	31.63 ± 0.46	32.45 ± 0.55	32.86 ± 0.58	/
	4	32.16 ± 5.79	29.54 3.32	32.64 ± 1.18	/
	5	32.91 ± 2.56	33.06 ± 2.01	34.15 ± 1.57	/
	6	34.58 ± 2.15	35.45 ± 1.65	35.63 ± 2.62	37.47 ± 0.62
	7	32.2 ± 0.52	30.4 ± 3.46	32.19 ± 0.46	30.48 ± 5
2	1	29.02 ± 1.11	28.64 ± 0.66	/	/
	2	33.33 ± 0.97	33.54 ± 0.61	/	/
	3	27.89 ± 0.22	29.22 ± 0.73	29.26 ± 0.28	/
	4	32.39 ± 0.61	33.71 ± 0.60	34.23 ± 0.58	/
	5	29.99 ± 1.8	30.18 ± 0.28	31.08 ± 0.94	/
	6	26.7 ± 0.68	26.73 ± 0.48	26.72 ± 0.34	27.07 ± 0.86
	7	29.95 ± 0.65	30.03 ± 0.4	30.03 ± 0.29	29.75 ± 0.41
3	1	29.53 ± 1.67	29.54 ± 1.31	/	/
	2	30.25 ± 0.85	29.17 ± 1.34	/	/
	3	28.98 ± 0.75	28.68 ± 1.19	28.73 ± 0.28	/
	4	29.87 ± 0.65	29.70 ± 1.04	28.93 ± 1.31	/
	5	30.86 ± 3.51	29.23 ± 0.32	26.63 ± 2.62	/
	6	28.44 ± 1.89	30.90 ± 1.04	29.23 ± 1.21	29.67 ± 0.31
	7	30.06 ± 2.33	33.72 ± 0.99	32.74 ± 0.56	32.34 ± 1.71

Annexe III : courbe d'étalonnage de la GSH

Réactifs utilisés :

- Tampon phosphate 0.1M PH=8.
- Glutathion réduit (GSH).
- DTNB10mM.
- TCA5%.

Mode opératoire :

La gamme de solution de GSH :

On prépare différentes concentrations:

- GSH 40mM : pour préparer la solution de glutathion 40 mM, on pèse 0.0614 6g glutathion et on ajoute 5ml de tampon phosphate de sodium.
- GSH 20mM : 2,5ml de la solution de GSH de 40mM +2.5 ml tampon phosphate de sodium.
- GSH 10mM : 2.5ml de la solution de GSH à 20mM +2.5ml de tampon phosphate de sodium.
- GSH 5mM : 2.5ml de la solution de GSH à 10mM +2.5ml de tampon phosphate.
- GSH 2.5mM : 2.5ml de la solution de GSH à 5mM +2.5ml de tampon phosphate.
- GSH 1.25mM : 2.5ml de la solution à 2.5mM +2.5ml de tampon phosphate.
- GSH 0.625mM : 2.5ml de la solution à 1.25mM +2.5ml de tampon phosphate.
- GSH 0.3125mM : 2.5ml de la solution à 0.625mM +2.5ml de tampon phosphate.

GSH (mM)	0.312	0.625	1.25	2.5	5	10	20
Solution	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇

S	50µl
Tampon phosphate	A 10 ml de
Mélange réactionnel	3 ml
DTNB	20µl

La lecture de la densité optique à 412 nm

GSH (mM)	0	0.312	0.625	1.25	2.5	5	10	20
DO	0	0.184	0.223	0.155	0.332	0.475	0.839	1.504

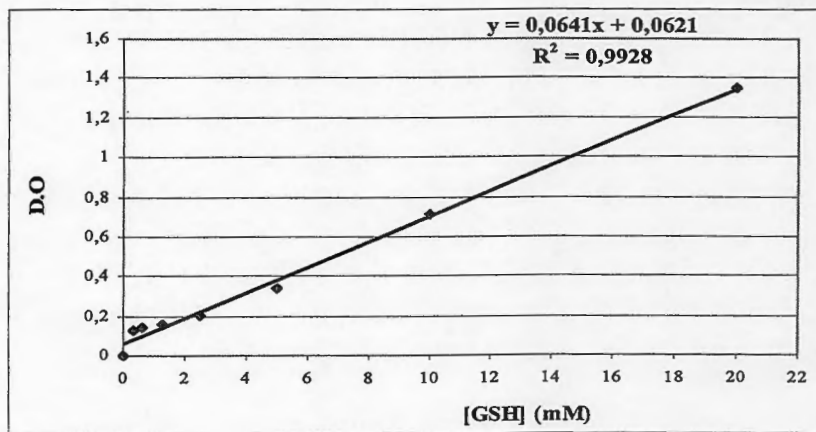


Figure 06: La courbe d'étalonnage du GSH.

Présenté par : -Deghdough Souaad
-Dermouchi Wahiba
-Khelifa Hiba

Date de soutenance : le 30/06/2008

Titre : Etude *In Vivo* de l'effet de l'extrait de Propolis sur la Modulation du GSH et de la Gamma Glutamyl Transpeptidase au Cours d'un Traitement Par Le Cyclophosphamide.

Résumé

La présente investigation qui s'inscrit dans le cadre d'une étude expérimentale, est réalisée au niveau du laboratoire de biologie de l'université de Jijel sur trois lots des souris Albinos de souche NMRI, (un lot témoin, un lot traité par le cyclophosphamide et un autre prétraité par la propolis et traité par le cyclophosphamide). Elle vis a évaluer certains paramètres intervenant dans le cycle gamma glytamyl à savoir le Glutathion et l'activité enzymatique de gamma glutamyl transpeptidase au cours d'un traitement par un médicament anticancéreux (cyclophosphamide) et les flavonoïde de la propolis.

Les résultats de dosages du glutathion cytosolique hépatique et rénal ainsi que la mesures des activités de la gamma GT hépatique et urinaire ont montré des variations inhérentes aux traitement par le cyclophosphamide. Ce type de médicament peut engendrer une toxicité du foie et du rein par la libération des radicaux libres. De ce fait l'effet préventif de la propolis a été mis en évidence sur la modulation des taux de GSH ainsi que sur l'activité de la GGT hépatique.

Summary

The present investigation is part of an experimental study which is realised in the Biology laboratory of Jijel's University. On three groups of NMRI mice (control group, cyclophosphamide treated group and pretreated group with propolis extract). It concerning the evaluation of some gamma glutamyl cycle parameters such as glutathione and gammaglutamyl transpeptidase (GGT) enzyme activity, while treated with anticancer drug (cyclophosphamide).

The assessment results of liver and kidney cytosolic glutathione levels, the urinary and liver GGT activity showed variations resulting from drug treatment. This kind of drug can undergo liver and kidney toxicity by its secondary metabolites. In this way, the preventif effect of propolis extract showed a modulation of GSH levels and liver GGT activity.

ملخص

إن نص هذه الدراسة يندرج في إطار بحث تجريبي في مخبر علم الأحياء بجامعة جيجل وقد أجريت علي ثلاث مجموعات من الفئران البيضاء NMRI (مجموعة شاهدة، مجموعة معالجة بالسيكلوفوسفاميد وأخرى معالجة بالسيكلوفوسفاميد والبر بوليس معا). وهذا ما يركز على إجراء معايرة عدة مقاييس وهي نسبة glutathion ونشاط الإنزيم gamma glutamyl transpeptidase والتي تدخل في حلقة gamma glytamyl و هذا أثناء المعالجة بالأدوية المضادة للسرطان (السيكلوفوسفاميد).

تنتج المعايرة للنسبة GSH الكبدية والكليوية، ونشاط الإنزيم GGT في الكبد والبول. تشير إلى أن هناك تغيرات في نشاط هذه الأخيرة ناتجة عن المعالجة بالسيكلوفوسفاميد. هذا النوع من المعالجة يتسبب في تسمم العديد من أعضاء الجسم و ذلك عن طريق إنتاج جذور اكسيجينية حرة و عليه لوحظ تأثير وقائي لمستحضر البروبوليس والذي يتمثل في تعديل نسبة GSH و نشاط GGT.

Mots-clés :

Glutathion, γ -GT, Propolis, Cyclophosphamide, Antioxydant, Anticancéreux.

Encadré par : M^{elle} BENGUEDOUAR L.