

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

CENTRE UNIVERSITAIRE DE JIJEL
ABDELHAK BENHAMOUDA
INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE

022

Bc. 08. 2003

MEMOIRE

01
01

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
D'ETUDES SUPERIEURES EN BIOLOGIE

OPTION : BIOCHIMIE

THEME

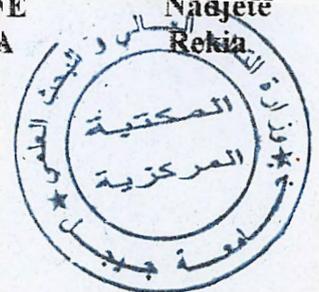
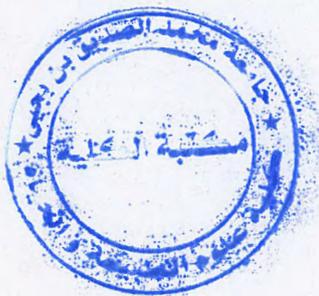
*Evaluation de la peroxydation
Lipidique au cours du
traitement par le Paracétamol
seul ou associé aux flavonoïdes*

Les membre de Jury :

Président : **HANDIS.** Med Seddik
Examineur : **KEBIECHE** Mohamed
Encadreur : **LAHOUEL** Mesbah

Réalisé par :

ROUBAH Hassiba
DOUKHANE Nadjete
BOUCHINA Rehia



Promotion 2003

Remerciement

On tient à exprimer nos vifs et sincère remerciement à :

- Mnsieur LAHOUEL Mesbah pour sa présence à tout moment, sa compétence et ses gracieux conseils afin de réaliser ce travail.
- M^{lle} BOULKOUR .S pour son aide et ses conseils.

Aussi nous tenons à remercier :

- Les membres de jury, Mr KEBIECHE .M, Mr HANDIS .M .
- Nos professeurs qui nous ont enseignés durant notre cycle de formation.
- Aux techniciens de laboratoire de l'institut de biologie
- Notre sincère gratitude pour tous ce qui nous aides de près ou de loin durant la réalisation de ce mémoire

- Hassiba
- Nadjete
- Rekia



أنا، لمها، شكر، مدير، المركز، العلمي، والبحث، العلمي، الجزائر،
رئيس، كرسي، لجنة، متابعة، هذه، أطذكرة،
ثبات، جميع، قطار، التي، كانت، مؤهولة،
عده، -

SOMMAIRE

Chapitre I : Introduction	01
Chapitre II- Analyse bibliographique	
II-1. Généralité sur le tissu hépatique	02
II-1-1. La structure membranaire des hépatocytes	02
II-1-2. Généralités sur les organites hépatocytaires.	03
II-1-3. Le rôle du foie dans le métabolisme	03
II-2. Le métabolisme des Xénobiotiques	03
II-2-1. Généralités	03
II-2-2. Notion de bioactivation	03
II-2-3. Le Cytochrome P-450	05
II-2-4. Notion de la détoxification	07
II-3. Les radicaux libres	08
II-3-1. Définition	08
II-3-2. Qu'est ce qu'un dérivé réactif de l'oxygène ?	08
II-3-3. Les sources des radicaux libres	10
II-3-4. Qu'elles sont les constituants cellulaires affectés par les radicaux libres ?	11
II-3-5. Les maladies liées aux dérivés réactifs de l'oxygène	11
II-3-6. Les radicaux libres ont ils un intérêt pour l'organisme ?	11
II-3-7. L'intoxication due au métabolisme des Xénobiotique.	12
II-3-8. Exemple d'intoxication par le paracétamol	12
II-4. La peroxydation lipidique	13
II-4-1. Définition	13
II-4-2. Les marqueurs de la peroxydation lipidique	14
II-5. Les flavonoides	17
II-5-1. Définition	17
II-5-2. Origine et localisation	17
II-5-3. Structure et biosynthèse	17
II-5-4. Les flavonoides et les radicaux libres	18
Chapitre III : Matériel et Méthodes	
III-1. Matériel	19
III-1-1. Entretien des animaux	19
III-1-2. Traitement des animaux	19
III-1-3. Prélèvement des échantillons	22

III-2. Méthodes	22
III-3. Evaluation statistique	25
Chapitre IV : Les Résultats α	
IV-1. Variation des concentration du malonyldialdehyde (MDA)	27
IV-1-1. Effet préventif des flavonoides au cours de l'intoxication par le paracétamol 100 mg/kg/orale	28
IV-1-2. Effet préventif des flavonoides au cours de l'intoxication par le paracétamol 200 mg/kg/orale	29
IV-1-3. Effet curatif des flavonoides au cours de l'intoxication par le paracétamol 100 mg/kg/orale	30
IV-1-4. Effet curatif des flavonoides au cours de l'intoxication par le paracétamol 200 mg/kg/orale	31
IV-2. Variation des protéine tissulaires	32
IV-3. Les calcules statistiques	32
Chapitre V : Discussion α	33
Chapitre VI : Conclusion α	36
Chapitre VII : Bibliographie α	37

Liste des abréviations :

NADPH : Nicotinamide Phosphate Réduit

CYP : Cytochrome

P-450 : Cytochrome P-450

GSSH : Glutathion -S-transférase oxydé

GSH : Glutathion -S-transférase réduit

DRO : Dérivés Réactifs de l'Oxygène

ROS : Reactive Oxygen Species

SOD : Supéroxyde Dismutase

e - : électron

RL : Radical Libre

PUFA : Polyunsaturated Fatty Acid : Acides gras polyinsaturés.

AMM : Autorisation de Mise sur Marché

REL : Reticulum Endoplasmique Lisse

REG : Reticulum Endoplasmique rugueux

TMP : Tetra-méthoxypropane

TCA : Trichloroacétique Acid

TBA : Acide Thiobarbiturique.

PBS : Phosphate Buffer saline

° / * : électron célibataire

S H : Groupement de thiol

PRE : Résonance Paraélectromagnétique

Chapitre I

Introduction

I - Introduction

Depuis longtemps, il est connu que les *radicaux libres* ayant des caractères particuliers les rend mutagènes et cancérigènes.

Il est également confirmé que les *radicaux libres* peuvent entraîner le phénomène de la *péroxydation lipidique*.

Aucune étude n'a été réalisée sur la *péroxydation lipidique* du *paracétamol*.

De plus, la dose seuil de *paracétamol* à partir de laquelle les métabolites réactifs attaquent les lipides membranaires du foie n'est pas connue. On ne sait pas s'il y a ou non *péroxydation* des lipides membranaires du foie au cours d'une intoxication par le *paracétamol*.

L'objectif de notre étude est de :

- Vérifier s'il y a *péroxydation lipidique* au cours d'une intoxication par le *paracétamol* ; elle est effectuée par le dosage du *dialdéhyde malonique (MDA)* .
- Déterminer le taux du *MDA* au cours de l'intoxication par le *paracétamol* 100 et 200 mg/kg/ orale.
- Evaluer l'effet préventif des *flavonoïdes* administrés sous forme de *Daflon* sur la toxicité du *paracétamol*
- Evaluer l'effet curatif des *flavonoïdes* sur la toxicité aiguë et subaiguë du *paracétamol*.

C'est alors, notre étude est menée pour mieux éviter ou au moins diminuer des effets toxiques du *paracétamol* en utilisant du *Daflon*.

Chapitre II

Analyse Bibliographique

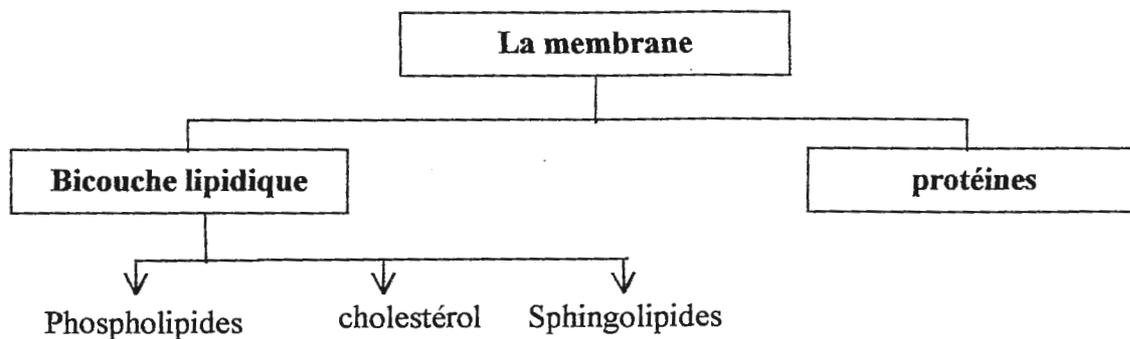
II- Analyse bibliographique

II-1. Généralité sur le tissu hépatique

Le foie peut être schématisé comme un ensemble continu de cellules homogènes (Hépatocytes). Accolées les unes aux autres en ménageant entre elles un réseau de canalicules biliaires, en contact avec un réseau de cellules endothéliales capillaires (5).

La membrane des hépatocytes comme tous les membranes cellulaires est un véritable barrière entre le milieu intra et extracellulaire (17).

III-1-1. Structure membranaire des hépatocytes



• Les phospholipides

Sont les composants principaux des interfaces entre les milieux intra et extra cellulaires. Ils sont disposés régulièrement en bicouche dans laquelle les acides gras polyinsaturés prédominent (24). Leur présence rend la membrane perméable aux molécules insolubles dans l'eau (32).

Les phospholipides sont répartis en :

-*Les phosphoglycerides (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine, phosphatidylcholines.*

Représentent 35 % du poids des lipides de la membrane plasmique des hépatocytes (17).

- *Les sphingomeylines:*

sont les phospholipides dépourvus du glycérol(13). Occupent 20 % du poids des lipides membranaires des Hépatocytes (17).

• Le cholestérol

Occupe 17% du poids des lipides membranaires, il intervient dans la fluidité de la membrane(17)

• Les protéines membranaires

On peut imaginer les protéines membranaires comme étant de petit "iceberg" flottant sur une mer de lipides, l'ensemble dessinant une sorte de mosaïque à la surface de la membrane. Les protéines sont classées en protéines intrinsèques et périphériques (32)

II-1-2. Généralité sur les organites hépatocytaires

La cellule hépatique comme toutes les cellules comporte un noyau; le centre des informations héréditaires, l'appareil de golgi, les Lysosomes, le reticulum endoplasmique (REG, REL).

• Le reticulum endoplasmique

Est une structure canalaire endoplasmique mise en évidence par sa résolution, au cours d'ultra centrifugation, en vésicules visibles en microscopie électronique : les microsomes (5). Les membranes des microsomes contiennent 35 % de lipides pour environ 65 % des protéines.

Dans leur face interne, sont retrouvés le cytochrome b5-NADPH Cyt C réductase, les *Cyt P-450* et de très nombreuses glycosyltransferases (5). Le REL intervient dans le métabolisme des lipides et dans les réactions de *détoxication* (32)

II-1-3. le rôle de foie dans le métabolisme

Le foie est une cible fréquente des toxiques pour plusieurs raisons (31), il est considéré le principal site de *biotransformation* (5). Ceci est expliqué par le flux sanguin très important du foie, organe épurateur, par rapport aux autres organes (36).

Les hépatocytes contiennent un grand nombre d'enzymes impliquées dans la transformation des médicaments, en particulier les réactions d'oxydoréduction, les hydroxylations .

L'élément fondamental de ce système enzymatique est le *Cyt P-450* des microsomes (36).

II-2. Le métabolisme des Xénobiotiques

II-2-1. Généralité

Les *Xénobiotiques* (X) sont des molécules de faible masse moléculaire étrangères à l'organisme comme les médicaments, les polluants atmosphériques, des composés d'origine alimentaires ... Nous y sommes constamment exposés (30).

Le terme de métabolisme fait référence à la transformation, par réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs autres composés actifs ou inactifs au plan pharmacologiques(35). Ce métabolisme peut être réaliser dans de nombreux tissus (peau, poumons ...). Néanmoins le principal site est situé au niveau hépatique (35).

II-2-2. Notion de bioactivation

Dans certains cas, le métabolisme des *Xénobiotiques* aboutit à des produits toxiques et induire des pathologies (28). C'est le cas où la *biotransformation* conduit à des métabolites plus toxiques que la molécule mère (7).

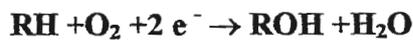
Les molécules hydrosolubles sont excrétées en générale sans modifications notables, conjuguées à divers substrats (1). Par contre des composés étrangers subissent des transformations chimiques dans l'organisme (30), c'est le cas des composés liposolubles qui tendent à être retenus par les macromolécules(1). La *biotransformation* occupe un grand intérêt car elle est indispensable à la prévention contre les accidents médicamenteux (14).

On distingue deux phases de métabolisme selon les processus de transformations induites par le grand nombre d'enzymes impliquées : réactions de phase I et celles de phase II (35)

• **Réactions de phase I : de fonctionnalisation**

L'oxydation, la réduction et l'hydrolyse sont des mécanismes des *biotransformations* regroupées sous le terme de « métabolisme de phase I » qui conduisent à des dérivés dont les groupements fonctionnels sont le plus souvent des hydroxyles (— OH), des amines (—NH₂) ou des carboxyles (—COOH) (35), qui peuvent être considérés comme des centres de conjugaisons (1)

- **Les réactions d'oxydation** : sont majoritairement localisées dans les microsomes hépatiques, elles consomment du NADPH (Nicotinamide diphosphate réduit), de l'oxygène moléculaire et passent par les *cytochromes P-450* (35). Dans cette réaction un atome d'oxygène moléculaire est réduit en eau et l'autre est incorporé dans le substrat selon la réaction suivante :



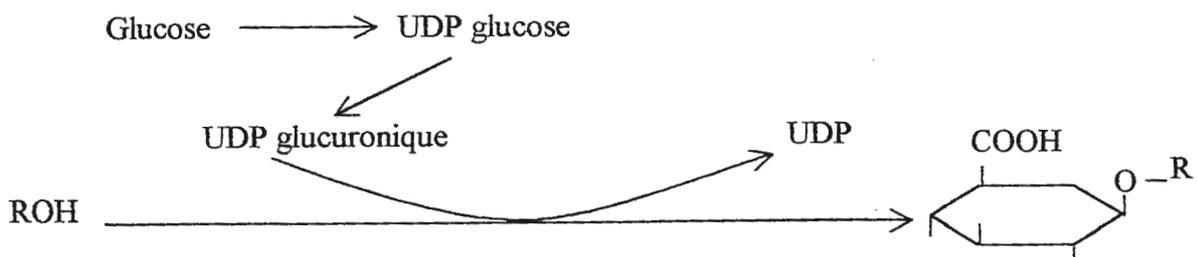
- **Les réactions de réduction** : sont beaucoup moins fréquentes, la réduction n'intervient pas exclusivement au niveau hépatique mais également dans l'intestin via la flore bactérienne (35).

- **Réaction d'hydrolyse** : c'est une voie métabolique banale, les enzymes de type estérases sont le plus souvent non spécifiques, la réaction d'hydrolyse par clivage d'un ester ou d'un amide est très rapide (35).

• **Réaction de phase II : de conjugaison**

Les groupements fonctionnels issus de phase I peuvent être ensuite conjugués. C'est la réaction de phase II. les mécanismes de conjugaison chez l'homme font généralement appel à l'acide glucuronique, au glycolle, au sulfate ou au *glutathion*.

- **Glucuroconjugaison** : est la plus fréquente des conjugaisons. Elle est catalysée par le système enzymatique de la glucuronyltransférase et concerne les molécules possédant un groupement hydroxylé, carboxylé ou aminé (35). La réaction globale est la suivante (7) :



- **La conjugaison au glutathion** : la réaction s'effectue entre le groupement (SH) de la cystéine et le reste polaire de la molécule (7). (voir la partie du glutathion page 7).

II-2-3. Le cytochrome P-450

Au cours de métabolisme des *Xénobiotiques*, le système enzymatique de fonctionnalisation le plus important est représenté par le groupe de *cytochrome P-450* (6).

Les *cytochrome P-450* sont des chromoprotéines possédant un noyau tétrapyrrolique et un atome de fer qui peut passer, selon l'état d'oxydation de Fe^{+3} à Fe^{+2} et réciproquement (12). Ces pigments sont ainsi dénommés car ils fournissent, à l'état réduit et en présence de monoxyde de carbone un spectre caractérisé par un maximum d'absorption à 450 nm (1).

• Structure et localisation

Le *cytochrome P-450* est localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse de différents organes (dans les microsomes) (12). Il est formé par une molécule d'hème (schématisée par un atome de fer, les quatre azotes du noyau tétrapyrrole) attaché sur un cystéinate d'une apoprotéine (schématisée par la partie rectangulaire). L'oxygène se fixe sur le fer de l'hème, les substrats se fixent sur une poche hydrophobe managée par l'apoprotéine (5) (voir *fig.(1)*). Parmi les rôles de l'apoprotéine est de stabiliser le contact fonctionnel et structural avec les autres composants du réticulum endoplasmique comme les flavoprotéines et le cytochrome b_5 qui participent comme donneurs d'électrons au *cytochrome P-450* (6).

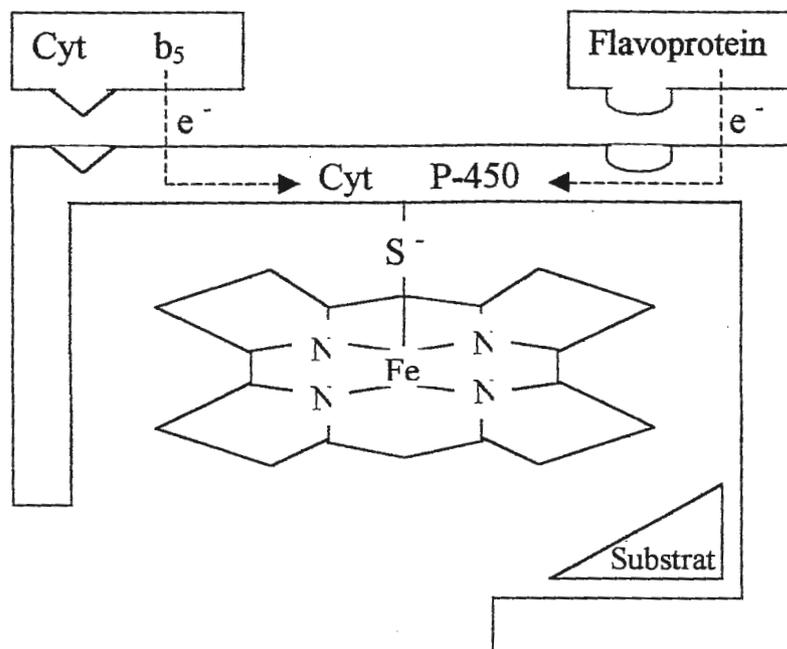
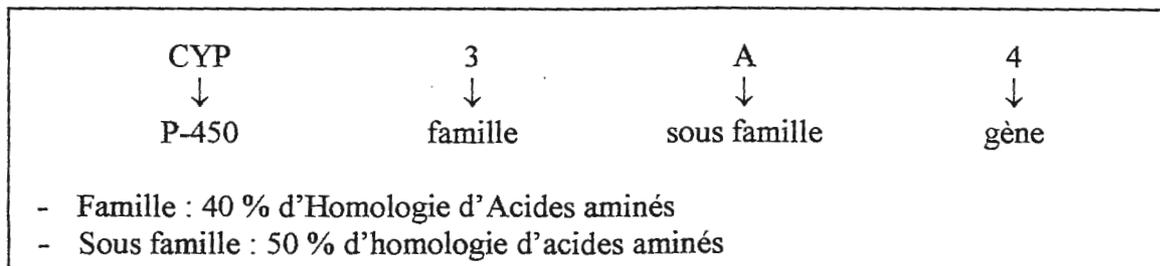


Fig (1) : Relation entre le Cyt P-450 et certains composants du réticulum endoplasmique (6)

• **Multiplicité des cytochromes P-450**

La première indication que le *cytochrome P-450* peut exister en plusieurs formes a été argumentée par des études effectuées sur l'effet des inducteurs chimiques sur le système *Cyt-P450* des microsomes hépatiques. Des différences qualitatives importantes ont été découvertes entre l'induction de 3 méthylcholanthrène et phénobarbitone qui stimulent la production de différents hémoprotéines. Ainsi un grand nombre d'enzymes *Cyt-P450* ont été isolé à partir du foie ; les isoenzymes : (CYP₁A₂, CYP₂C₉, CYP₂D₆ ...). Ces isoenzymes expriment une mobilité électrophorétique différente selon la taille moléculaire, réponse au inducteurs et inhibiteurs. On peut exprimer la base de classification comme suivant :

Exemple: CYP₃A₄ (6).



• **Les inducteurs et les inhibiteurs de Cyt P-450**

- Des agents chimiques peuvent stimuler le *Cyt P-450*, par action directe, possible comme effecteurs allostériques (6) .

On note que l'induction d'une isoenzyme est souvent associée à la répression des autres. L'inducteur est actif au niveau de la transcription élevant la synthèse de l'ARN_m.

- Le cas le plus commun est la compétition entre différents agents chimiques pour le même isoenzyme. Le degré d'inhibition dépend de la concentration relative, et l'affinité aux deux agents. L'autre inhibition s'effectue par le métabolite formé lui même (6).

	CYP ₁ A ₂	CYP ₂ C ₉	CYP ₂ D ₆	CYP ₃ A ₄
Substrat	Caféine	Arfarine	Codéine	Statine
Inhibiteurs	Cimetidine	Isoniazide	Quinidine	Macrolide
Inducteurs	Rifampicine	Rifampicine		Carbamézipine

• **Le Cytochrome P-450 et la Toxicologie**

Les *cytochromes P-450* sont les principales enzymes intervenant dans la phase I du métabolisme des *Xénobiotiques*, ils amorcent le processus d'élimination des composés indésirables, cependant les métabolites qu'ils produisent peuvent être toxiques s'ils ne sont pas transformés rapidement et éliminés (16). L'exemple le plus envisagé est celui du *paracétamol* :

Le *paracétamol* est métabolisé à l'aide du *Cyt P-450* pour donner un métabolite réactif (*N-acétyl-P-benzoquinone Imine*) qui va réagir aux macromolécules cellulaires en endommageant les structures cellulaires et conduisant au *Nécrose* (21).

• **Transport extra-cellulaire**

Après l'étape d'activation, qui est assurée par les *Cyt P-450*, et l'étape d'inactivation par conjugaison avec une molécule endogène, il arrive l'étape d'excrétion où les produits conjugués sont pris en charge par des protéines de transport membranaires qui les expulsent hors de la cellule. l'excrétion est particulièrement rénale (urine) mais aussi hépatique (bile) (30).

II-2-4. Notion de la détoxification

Le métabolisme des *Xénobiotiques* aboutit dans la majorités des cas à des produits non toxiques, peu réactifs et faciles à éliminer (30).

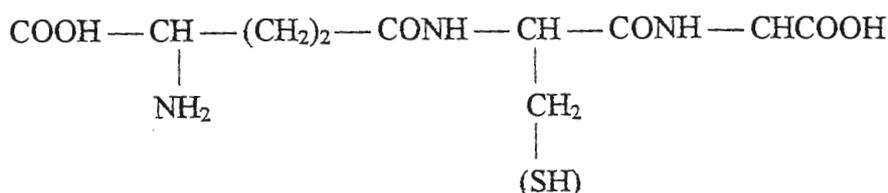
La *détoxification* concerne l'élimination des métabolites toxiques et des *radicaux libres* produits lors du métabolisme des produits chimiques (27).

• **Le glutathion**

Le *glutathion* est un tripeptide particulièrement intéressant (4) c'est le thiol intracellulaire qui a le plus faible poids moléculaire. Il existe sous deux formes ; une forme oxydée « *GSSH* » (moins abondante) est une forme réduite « *GSH* » (la plus abondante : plus de 99 % de la concentration totale) (15)

- Structure

Le *glutathion* est un tripeptide qui se compose de trois acides aminés : l'acide glutamique, la cysteine et la glycine (voir structure). La cysteine est l'acide aminé essentiel à la synthèse du *glutathion* (33).



La cysteine apparaît souvent dans les protéines sous forme oxydée ou cystine.

- Localisation

Le *glutathion* (*GSH*) est très répandu dans les tissus, particulièrement dans les érythrocytes et le foie (5). Son taux intracellulaire varie entre 0,5 et 10 mM, alors que le taux sanguin est de l'ordre de micromolaire (4).

- Métabolisme du glutathion

Les concentrations tissulaires de « *GSH* » sont considérablement plus importantes que celle de cystéine, cystine ou de la méthionine, ce qui suggère le stockage de la cystéine sous forme de *glutathion*. Le pool cellulaire de *GSH* est la résultante de leur synthèse et sont Turnover (4).

- **Rôle du glutathion** : Le *glutathion* exécute plusieurs tâches essentielles dans l'organisme : c'est le principal antioxydant propre de la cellule (37), en outre la plupart des réactions connues en toxicologie sont de type « *détoxication* », le « *GSH* » se liant par son pôle —SH aux *Xénobiotiques* ou a un métabolite toxique (agent nucléophile) (5). L'exemple le plus démonstratif étant l'intoxication au *paracétamol* dont la toxicité hépatique n'apparaît qu'avec la déplétion du foie en *glutathion* (5). En addition, il occupe un rôle primordial dans la synthèse des protéines et de l'ADN (15). Comme il joue un rôle clé dans la défense de l'organisme contre les agents polluants et le rayonnement ultraviolet (37)

- **Les acides mercapturiques** : Dès 1879, il a été constaté que l'administration de bromobenzène à des chiens conduisait à l'excrétion urinaire de composé chimique qui ont été dénommés « *acides mercapturiques* » qui sont des dérivés thioéther d'acétyl cystéine du produit administré. La chute du taux de *glutathion* est corrélée à la quantité d'*acides mercapturiques* formée. La première étape de leurs synthèse est la conjugaison du composé étranger avec le *glutathion*, réaction qui est catalysée par la *glutathion-S- transferase* (15).

II-3. Les radicaux libres

II-3-1. Définition

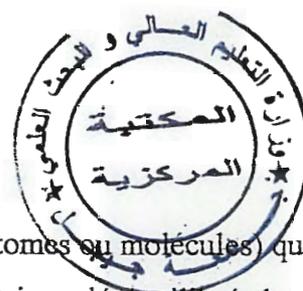
Les *radicaux libres* sont une forme particulière des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possède un *électron célibataire* (non apparié) (30). Cette structure électrique déséquilibrée leur confère une grande réactivité sur les constituants organiques et sur les structures cellulaires par l'acceptation d'un électron des molécules voisines pour combler la vacance de leur orbital. Ils se forment d'une façon inévitable et par une multitude des voies (28).

Ils sont issus d'une façon essentielle de l'O₂ et de l'azote (29). L'ensemble des *RL* et de leur précurseurs est souvent appelé *Dérivés réactifs de l'oxygène* « *DRO* »

II-3-2. Qu'est ce qu'un Dérivé réactif de l'oxygène ?

L'oxygène que nous respirons est une molécule constituée de deux atomes (34).

Leur métabolisme normal produit de faibles quantités de *DRO* mais dans certains situations leur taux est augmenté (34).



Les dérivés réactifs de l'oxygène (soit qui sont issus de l'oxygène soit celles de l'azote) sont des adduits normaux du métabolisme. Chez un sujet sain, leur production correspondrait à 3% de la quantité totale d'O₂ consommé.

Le *stress oxydant* est observé lorsque la production des espèces oxygénées réactives dépasse les capacités de défense des tissus (26).

Le *stress oxydatif* peut activer plusieurs protéines kinases ou phosphatases et médier des voies de signalisations spécifiques dans la cellule conduisant à la modulation de l'expression de certains gènes(2).

II-3-3. Sources des radicaux libres

Les *DRO* peuvent apparaître au cours de différents types de réactions, la respiration est indispensable à la vie de nos cellules. Or ce phénomène indispensable à la vie est à l'origine même de la production de *radicaux libres* (O₂⁻, OH° ..) qui sont des *DRO* (36).

Une production continue d'anion O₂⁻ se produit lorsque la chaîne respiratoire fonctionne ; production que l'on peut comparer au déchets inévitablement rencontré lors de la fourniture industrielle fort logiquement, la production mitochondriale des *DRO* dépend de la disponibilité en O₂, elle augmente avec la pression partielle de l'O₂ et diminue lorsque celle-ci baisse (33).

L'anion O₂⁻ provient de réactions biochimiques catalysée par le *NADPH oxydase* de la phagocytose (9).

L'O₂⁻ permet la formation de H₂O₂ puis ClO⁻ (*hypochlorite*) à rôle bactéricide (19).

La Xanthine-oxydase peut donner naissance au O₂⁻ en présence d'oxygène et de Xanthine ou d'hypoxanthine (33).

Les métaux toxiques (chrome ...) mais aussi le cuivre libre génère de °OH à partir d'H₂O₂ par la réaction de Fenton (24).

Beaucoup de cellules sont capables de produire de NO° à partir d'arginine et d'oxygène via la NO-synthase, rappelons que la production concomitante dans un même lieu de NO° et O₂⁻ s'avère très dommageable en donnant naissance en ONOO⁻(24).

La fig (2) présente les *RL* issus de l'O₂ et leur relation au *RL* issus de l'azote :

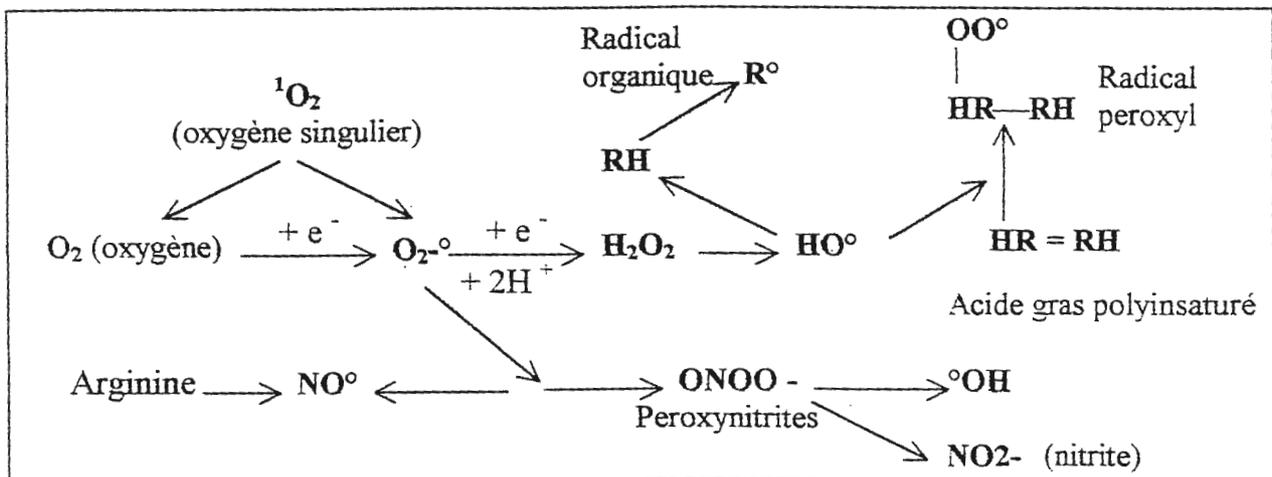


Fig (2) : Relation entre les radicaux libres issus de l'O₂ et celles de l'azote (32)

La toxicité de l'O₂ résulte de sa capacité à former des *RL* elle même liée à sa structure moléculaire inhabituelle faite de deux atomes possédant six électrons périphériques dont deux sont mis en commun et cinq gravitent autour de chaque noyau (18).

L'appellation « *Dérivés réactifs de l'oxygène* » ou « *Reactive oxygen species ROS* » n'est pas restrictive, elle inclut les *radicaux libres* de l'oxygène proprement dit [*radical superoxyde* (O₂⁻), *radical hydroxyl* (OH), *monoxyde d'azote* (NO)] mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires [*peroxyde d'hydrogène* (H₂O₂), *peroxynitrite* (ONOO⁻)] (33).

- **L'anion superoxyde O₂⁻**

La réduction de l'oxygène moléculaire par un électron forme l'*anion superoxyde*, cette production se fait soit par voie enzymatique (ex : NADPH -oxydase) soit par auto-oxydation de *RL* à potentiel d'oxydoréduction plus électronégatif que l'O₂. il est peu réactif en milieu aqueux(34).

- **Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)**

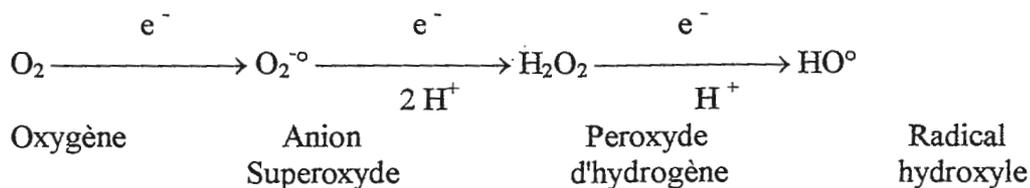
La toxicité du *superoxyde* O₂⁻ est atténuée par réduction en H₂O₂ par une *Superoxyde dismutase* « *SOD* » (18).

L'absence de charges électriques à sa surface le rend très lipophile et peu réactif en milieu aqueux (34).

- **Le radical hydroxyl (HO°)**

Représente l'O₂ moléculaire réduit par trois électrons. Il est formé par la dégradation du H₂O₂ en présence de métaux libres comme Fe⁺² de transition sous leur forme réduite (*Réaction de Fenton*) (34).

La réaction suivante résume l'ordre de production des trois radicaux précédemment cités (9) :



- **Les radicaux péroxyles ROO°**

Formés par l'addition d'oxygène moléculaire sur des *radicaux libres* de carbone, ils sont peu réactifs et diffusent facilement à travers les membranes biologiques (34).

- **Les Hydroperoxydes organiques(ROOH)**

Des formes protonées des *radicaux péroxyles*, ils sont très réactives et se décomposent en ROO° ou en radicaux *Alcoxyles* RO°

Comme les *RL* précédemment illustrés sont issus de l'oxygène, il se trouvent un certain nombre des *RL* issus de l'azote comme le NO° et ONOO° (36)

II-3-4. Quelles sont les constituants cellulaires affectés par les radicaux libres?

Les *RL* peuvent toucher plusieurs constituants cellulaires :

- **Les lipides membranaires**

Les formes les plus réactives de l'O₂ peuvent initier la *péroxydation lipidique* de nombreux produits sont générés lors de la *péroxydation* des lipides : *diènes conjugués, MDA* ... (voir *péroxydation lipidique* page 13)(31).

- **Les protéines**

Les acides aminés, de part leur structure possèdent des susceptibilités différents vis à vis des radicaux et des oxydants (29).

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui possèdent un groupement thiol (*SH*) Exp : $RH - SH + OH^\circ \longrightarrow R - S^\circ + H_2O$ (31).

- **Les acides nucléiques**

La molécule d'ADN est une cible importante pour les attaques radicalaires. Les modifications observés après action du OH[°] sont très nombreux : conversion des résides thymine en thymine glycoole et en 5- hydroxyde méthyluracil, ce qui affecte la réplication du génome (31).

II-3-5. Les maladies liées aux dérivés réactifs de l'O₂

Les *radicaux libres* sont responsables d'un grand nombre de processus dégénératifs; accélérant le vieillissement de nos tissus. Les altérations par les *radicaux libres* des parois cellulaires font le lit des affections des artères et de cœurs telles que l'artériosclérose et l'infarctus.

Le *stress oxydatif* entraîne des maladies neurogénératives comme la maladie de Parkinson, le catarate et l'arthrite. Quand aux lésions de l'ADN cellulaire, elles sont responsables de certains cancers liés à l'âge (23). Le NO[°] par exemple provoque des phénomènes d'inflammation après inhibition des enzymes à groupement prosthétique l' "Hème" et déclenche la *péroxydation* de composants tissulaires (Darely 1995) (29).

II-3-6. Les radicaux libres ont ils un intérêt pour l'organisme ?

Les *radicaux libres* favorisent habituellement le bon fonctionnement de l'organisme:

Lés propriétés de monoxyde d'azote NO[°] illustrent certains effets favorables des *RL* sur l'organisme ; la régulation de la concentration et la relaxation des muscles lisses des vaisseaux sanguins, l'absorption de l'eau dans le tractus digestifs, la stimulation des vitesses de croissance, la transmission des signaux et la régulation du métabolisme de la cellule (IZZO 1998) (29).

Ils possèdent ainsi une activité antimicrobienne utile avec le ClO[°] (hypochlorite)(19).

II-3-7. L'intoxication due au métabolisme des Xénobiotique (les métabolites réactifs)

La majorité des cas hépatique aiguës médicamenteux est la conséquence de la formation d'un métabolite réactif au cours de la phase I (10).

Ces métabolites sont généralement formés par oxydation, ils ont en commun la possibilité de se fixer sur les constituants de la cellule, en particulier les molécules hépatiques (protéines, lipides) par une liaison covalente irréversible (3), ils sont considérés comme des véritables bombes moléculaires (21).

La formation du métabolite réactif consomme du *glutathion* quand elle est importante, cela aboutit à une déplétion du *glutathion* ce qui à pour principale conséquence : la *péroxydation lipidique*, et une oxydation des groupes thioles des protéines (21).

II-3-8. Exemple d'intoxication par le paracétamol

Le *paracétamol* ou l'*acetaminophène* est un produit chimique qui possède dans sa structure, un cycle benzène, un groupement hydroxyl (OH) et un groupement amide (11) sa toxicité issue de sa transformation par oxydation en *N-acétyl-p-benzoquinone Imine* via le *Cyt P-450*.

Le jeûne augmente également la toxicité du *paracétamol* par deux mécanismes :

La déplétion en *glutathion hépatique*, qui détoxifie normalement les métabolites toxiques du *paracétamol*.

L'introduction des voies produisant le métabolite toxique (21)

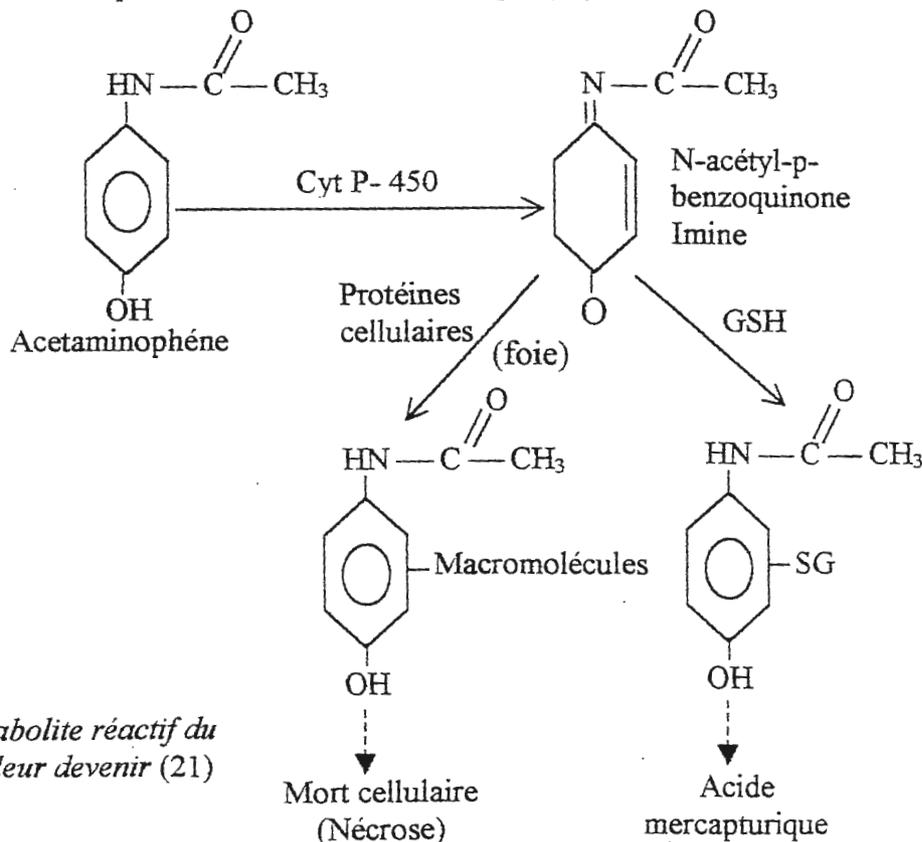


Fig (3) : Le métabolite réactif du paracétamol et leur devenir (21)

II-4. La peroxydation lipidique

II-4-1. Définition

De nombreuses réactions *in vitro* au hypothétique ont déjà été décrites. L'hypothèse de l'effet toxique de « l'excès d'oxydation » des lipides à un grand intérêt en toxicologie et en médecine (5). La *peroxydation lipidique* est un des plus ancien effet connu des *radicaux libres* (26), c'est une lésion moléculaire observée avec les médicaments transformés en *radicaux libres*, cette lésion survient lorsqu'il existe un déséquilibre entre la formation et la *détoxication des métabolites réactifs*, ceci peut être lié soit à une hyperproduction des *métabolites réactifs*, un défaut de *détoxication*, ou à l'association des deux (21).

Les structures les plus exposées à la *peroxydation lipidique* sont les membranes cellulaires riches en acides gras *polyinsaturés* (*PUFA : Poly Unsaturated Fatty Acid*) (19) qui sont caractérisées par la structure divinyl méthane, structure particulièrement apte à perdre un atome d'hydrogène pour former de l'eau (avec le radical OH°) et un *radical libre* R° (5). Ce radical se stabilise par réarrangement en un *diène conjugué* (25).

En générale la *peroxydation lipidique* entraîne des perturbations de la microarchitecture membranaire, altère les fonctions des enzymes, transporteurs et perméabilité membranaires (31) et par conséquent le vieillissement et la *nécrose cellulaire* (9).

La *peroxydation lipidique* comporte trois phases : initiation – propagation et terminaison (19).

• La phase d'initiation

Caractérisée par l'attaque de la chaîne acylée d'un *PUFA* par OH° au niveau du $\text{—CH}_2\text{—}$ situé entre les deux liaisons insaturées pour former un *radical lipidique* (19) qui se stabilise par réarrangement en un *diène conjugué* (25).

• La phase de propagation

Caractérisée par l'addition d'une molécule d'oxygène pour former un *hydroperoxyde lipidique* (26)

La phase de terminaison

Qui est à l'origine de divers hydrolipopéroxydes, d'aldéhydes et de traces d'hydrocarbures (éthane, pentane) (19).

Ces trois phases peuvent être regroupées dans le schéma suivant (26) :

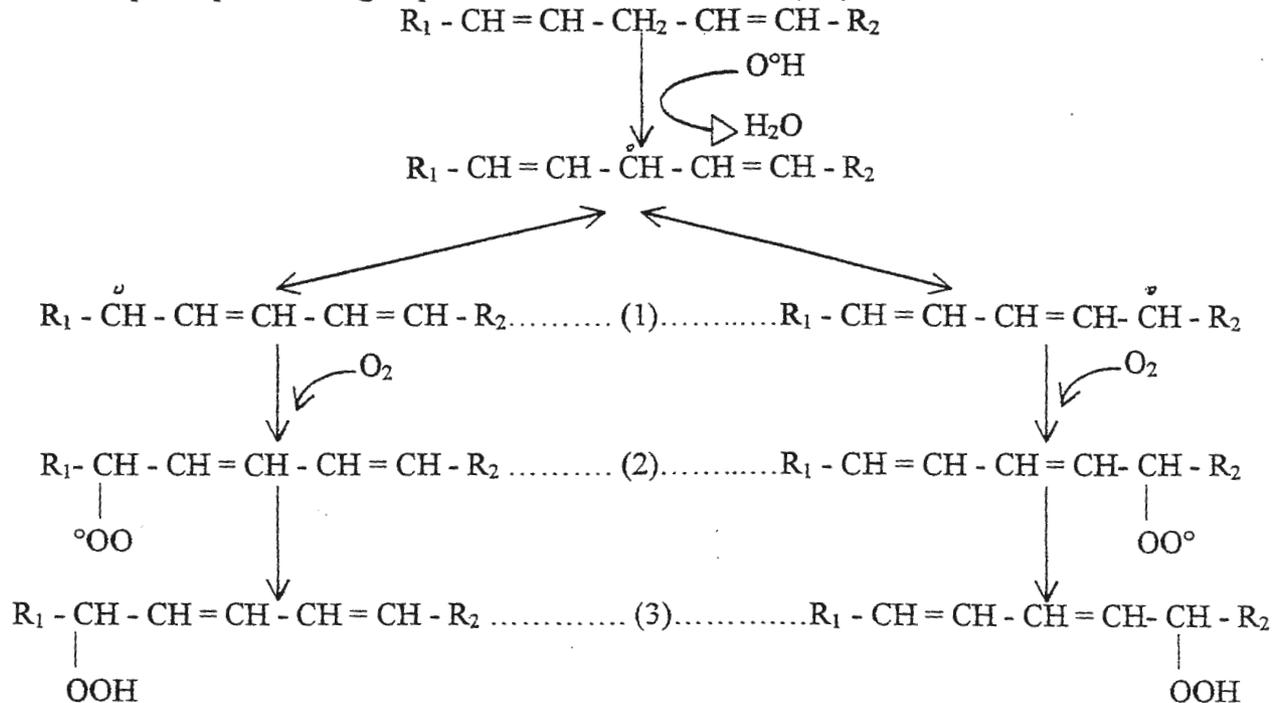


Fig (4) : formation des diènes conjugués (1), radicaux peroxydes (2) et hydroperoxydes (3) (26)

II-4-2. Les marqueurs de la peroxydation lipidique

La *peroxydation lipidique* peut être évaluée par la mesure de : la disparition des *PUFA*, la consommation d' O_2 , l'augmentation des *hydroperoxydes lipidiques*, l'augmentation des *diènes conjugués*, *MDA* et des autres aldéhydes, augmentation des produits de dégradation des *hydroperoxydes*, l'évolution des hydrocarbures gazeux où la détection des *radicaux lipidiques* (26).

1- Disparition des acides gras polyinsaturés

La mesure de la disparition des *PUFA* comme index de la *peroxydation lipidique* a été utilisée par des systèmes biologiques *in vitro*, dans des microsomes de foie de rat, soumis à *peroxydation*, la disparition de l'acide arachidonique et de l'acide docosahexaénoïque a été décrite pour la première fois par MAY et MCCAY (26).

2- Consommation d'oxygène

La mesure est réalisée à l'aide d'un électrode, permettant le suivi au cours du temps de peroxydation, ceci est important pour déterminer l'effet d'antioxydants sur la durée de la période d'induction (26).

3- Radicaux lipidiques libres

La seule technique utilisable est la *PRE* (*Résonance paraélectromagnétique*) mais son utilisation est limitée, car la sensibilité est faible et la concentration aux radicaux doit être importante (10^{-6} M) (26).

4- Les diènes conjugués

Les molécules comportant un *diène conjugué* sont caractérisées par une absorption intense la lumière ($\lambda_{\max} = 233 \text{ nm}$), leur mesure est réalisée après extraction par un solvant (chloroforme, méthanol ...) (26).

5- Les hydroperoxydes

Se sont les premiers produits de la *péroxydation lipidique* relativement stables, ils perdent cette stabilité en présence d'ions métalliques d'agents réducteurs et de certains enzymes. Le nombre des *hydroperoxydes lipidiques* possibles dépend du nombre de double liaison et est égale à $2n-2$ par exemple : l'acide arachidonique possède quatre doubles liaisons donc donne six hydroperoxydes (26).

6- Les Aldéhydes

Au cours de la *péroxydation lipidique* un nombre important d'aldéhydes sont formés par cassure des *hydroperoxydes lipidiques*, la plupart sont très réactifs et peuvent être considérés comme des seconds messagers toxiques, on peut distinguer (26) :

a- l'hydroxynonanal (4-HNE) : C'est l'un des aldéhydes les plus importants dans la *péroxydation lipidique* en terme de quantité et d'activité biologique

Les valeurs normales de 4-HNE dans le plasma d'un sujet sain est 0,08 – 0,7 micromolaire (26)

b- Le dialdéhyde malonique (MDA) : A ce jour, le marqueur le plus utilisé pour déterminer un *stress oxydant* reste le MDA. C'est le *bêta-dialdéhyde tricarboné* le plus simple produit lors de la coupure des *PUFAs*, possédant au moins trois doubles liaisons, il peut également être formé à partir de composés non lipidiques tel que l'acide ascorbique, les acides aminés, le desoxyribose ou le saccharose lorsqu'ils sont exposés au OH° (26).

La voie de synthèse de MDA à partir des *PUFAs* est représentée dans la Fig.(5). (25)

La toxicité de l'MDA est due à sa capacité à altérer une quantité importante de molécules biologiques (lipides, protéines ...).

Il se trouve quatre formes tautomériques de l'MDA (voir Fig.(6)), la valeur du PK du groupe énolique est égale à 4,50 représentés ci dessous (25) :

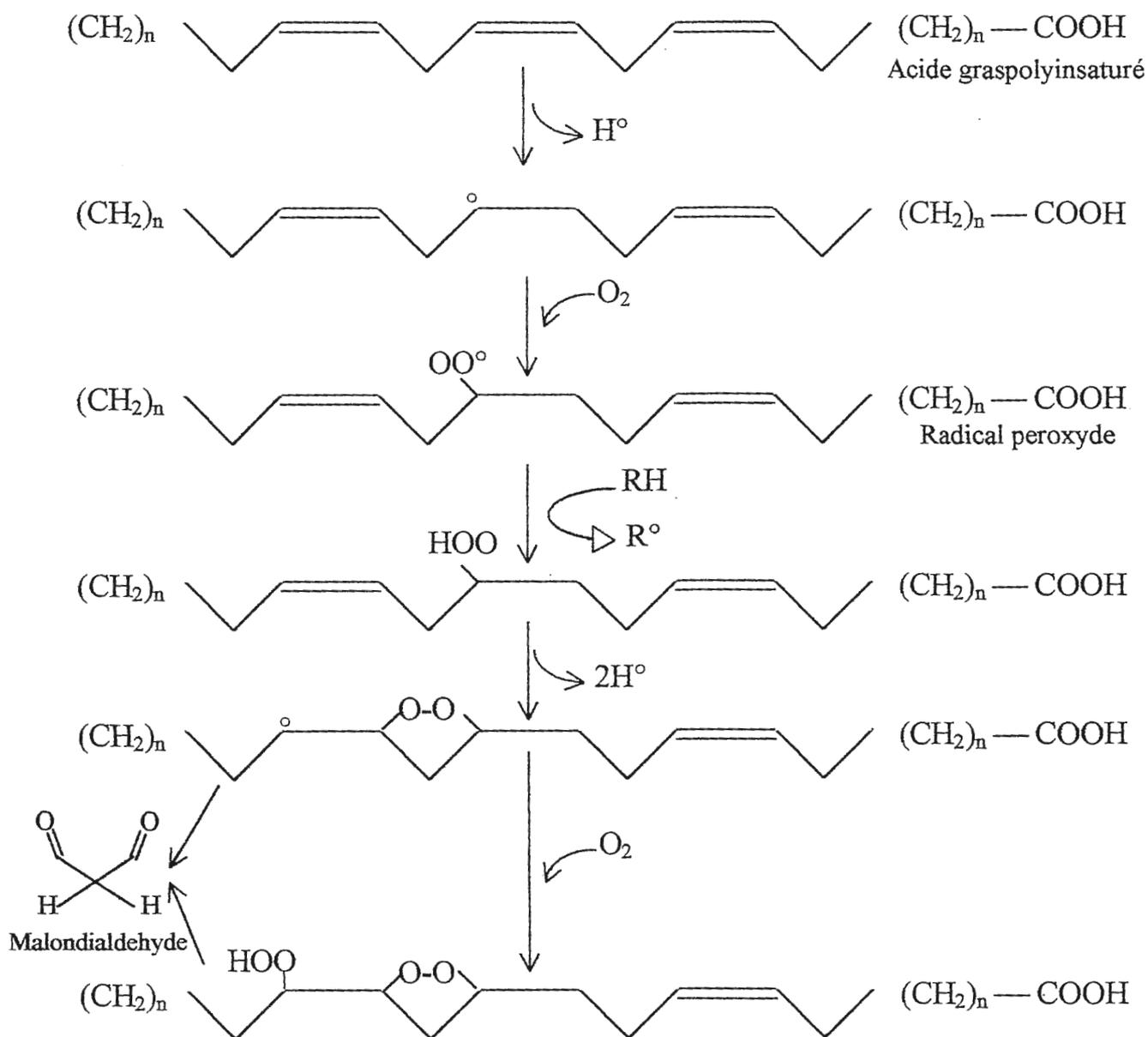


Fig (5) : Voie de synthèse du malondialdehyde à partie des acides gras polyinsaturés (25)

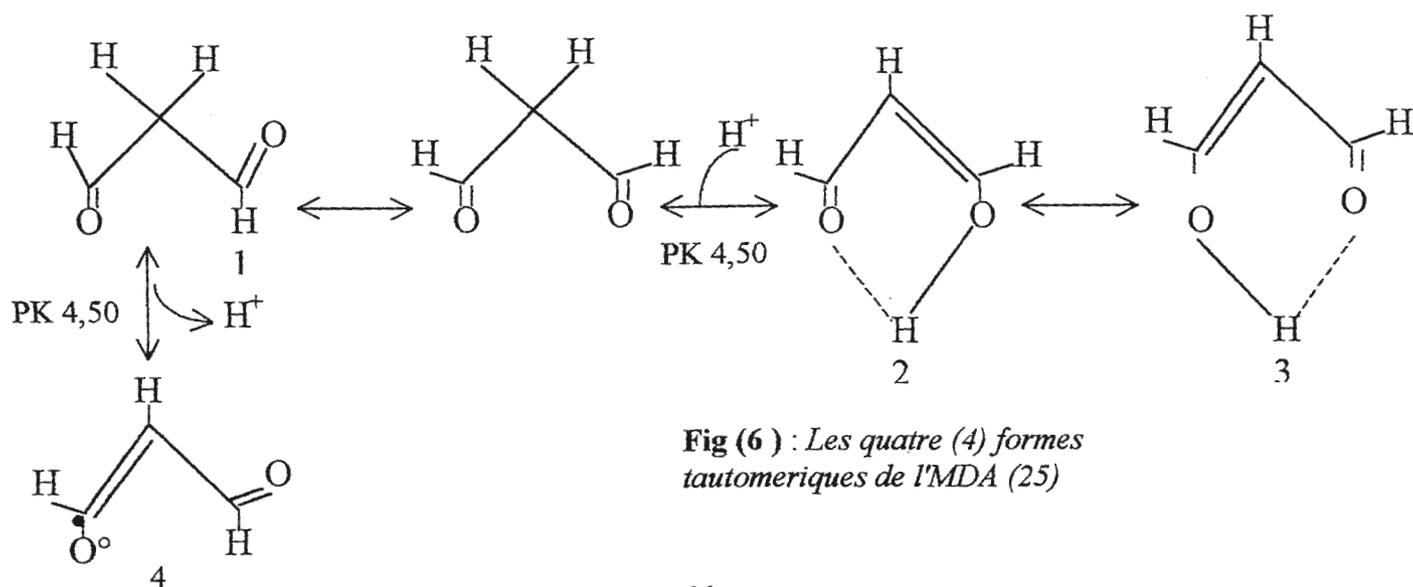
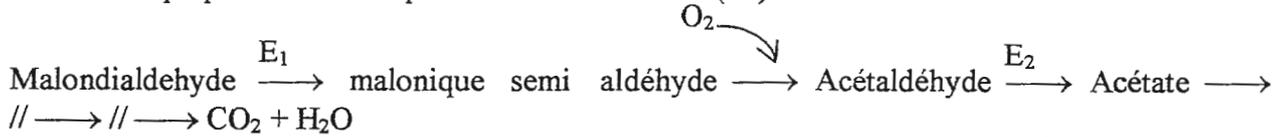


Fig (6) : Les quatre (4) formes tautomeriques de l'MDA (25)

• **Le métabolisme de l'MDA**

Dans le foie, le *malondialdéhyde* peut être transformé en CO₂ et H₂O par des métabolisation successive qui peut être décrit par la réaction suivante (26) :



E₁ : aldéhyde deshydrogénase mitochondriale
 E₂ : l'acétaldéhyde deshydrogenase

II-5. Les flavonoides

II-5-1. Définition

Le nom *flavonoïde* est dérivé du nom grec « FLAVUS » qui veut dire jaune. Les *flavonoïdes* lato sensu sont des pigments quasiment universel des végétaux, presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (11).

Le chef de file de cette tendance est le *DAFLON* dont le premier AMM (autorisation de mise sur marché) remonte à 1969 (20).

II-5-2. Origine et localisation

On trouve les *flavonoïdes* dans les agrumes qui appartiennent à la classe des aurantiacées, mais également dans les rotacées (Tomates, sarrasin ...), les oléacées (cypres, frêne), les conifères (20). Il sont présents dans tout les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits (22).

II-5-3. Structure et biosynthèse

Les *flavonoïdes* possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbones, constitués de deux cycles en C₆ (A et B) reliés par une chaîne en C₃ selon la figure suivante (23) :

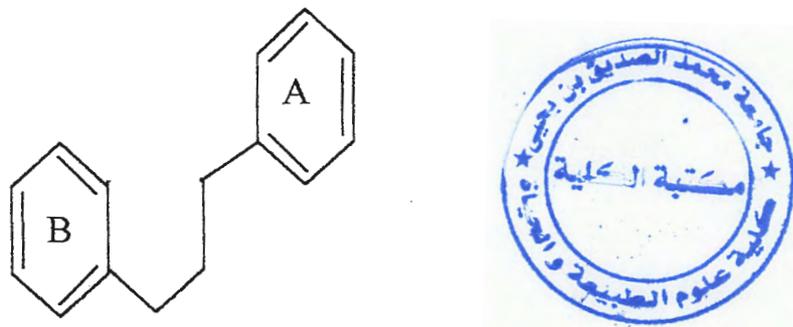


Fig (7) : Squelette de base des flavonoides (23)

La biosynthèse des *flavonoides* se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6' tetrahydroxychalcone, par l'action d'enzyme, cette chalcone de couleur jaune est métabolisée en différentes classes de *flavonoides* : Flavonone, aurone (jaune), Flavononol, Flavone, anthocyanidine (rouge bleu) ...

Les composés de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupement hydroxyles, méthoxyles et autre ...) sur les deux cycles aromatique A et B et la chaîne en C₃ intermédiaire (38).

II-5-4. Les flavonoides et les radicaux libres

Les biens faits pour notre santé des *flavonoides* semblent être étroitement liés à leurs exceptionnelle capacité à piéger et neutraliser les *radicaux libres* et donc submerger les différences naturelles de l'organisme, cette capacité est liée à leur structure qui permet la fixation de deux atomes d'hydrogènes fournis par les deux fonction phénol (20).

Un grand nombre des *radicaux libres* formés dans diverses circonstances, peut être dégénère par les *flavonoides*, l'anion supéroxyde forme au cours de l'anoxie et l'inflammation, le radical hydroxyl, Alkoryl lipophile formes au cours de l'auto-oxydation lipidique (11).

Chapitre III

*Matériels
et Méthodes*

III - Matériel et méthodes

III-1. Matériels

III-1-1. Entretien des animaux

Notre travail est réalisé sur des rats femelles de souche « WISTAR » (de l'institut pasteur d'Agler) pesant 200g en moyenne.

Avant et après le traitement les animaux sont élevés dans des cages métalliques couvertes de grilles, l'alimentation se compose de croquettes et d'eau, la température de l'animalerie est d'environ 20-25°C

III-1-2. Traitement des animaux

• Doses étudiées des médicaments

Préparation du paracétamol (paralgon 500 mg/ comprimés)

Nous avons étudié l'effet de deux doses différentes la première de 100 mg/Kg et correspond à 1/3 de la DL₅₀ (égale à 300 mg/Kg -oral) et la 2^{ème} dose de 200 mg/Kg correspondant à 2/3 la DL₅₀ pendant trois (3) jours. Cette étude est réalisée sur 42 rats répartis en 7 groupes de 6 rats chacun.

Le *paracétamol* comprimé 500 mg (laboratoire UPSA, lot 2956) est dissout dans l'eau distillée selon les calculs suivants :

Groupe 1 : considéré comme témoin les rats reçoivent 1 ml de l'eau distillée.

Groupe 6 : les rats reçoivent 1/3 de la DL₅₀ :

$$\begin{array}{l} 100 \text{ mg} \longrightarrow 1000 \text{ g} \\ x \longrightarrow 225,2 \text{ g} \end{array} \quad \text{Donc : } x = 22,5 \text{ mg / rat}$$

Un rat de 0,2252 kg reçoit 22,5 mg de paralgon

Le volume administré est 1 ml/ rat donc la préparation du médicaments est :

$$\begin{array}{l} 22,5 \text{ mg} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\ 500 \text{ mg} \longrightarrow x' \end{array} \quad \text{Donc : } x' = 22,2 \text{ ml de H}_2\text{O}$$

Groupe 7 : les rats reçoivent 2/3 de la DL₅₀ :

$$\begin{array}{l} 200 \text{ mg} \longrightarrow 1000 \text{ g} \\ x_1 \longrightarrow 168 \text{ g} \end{array} \quad \text{Donc : } x_1 = 33,6 \text{ mg / rat}$$

Un rat de 0,168 kg reçoit 33,6 mg de *Paralgon*

Le volume administré est 1 ml/ rat donc la préparation du médicaments est :

$$\begin{array}{l} 33,6 \text{ mg} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\ 500 \text{ mg} \longrightarrow x_1' \end{array} \quad \text{Donc : } x_1' = 14,8 \text{ ml de H}_2\text{O}$$

Préparation de Daflon

Nous avons utilisés du *Daflon* 300 mg/ comprimé de 150 mg de diosmine et 150 mg de hésperidine (laboratoire SERVIER, A.M.M France n° 311573-2)

La dose thérapeutique est de 12 comprimés / jour / 60 kg :

Donc de $12 \times 300 = 3600$ mg / jour / 60 kg

La posologie

$$\begin{array}{l} 3600 \text{ mg} \longrightarrow 60 \text{ kg} \\ x \longrightarrow 1 \text{ kg} \end{array} \qquad \text{Donc : } x = 60 \text{ mg / kg}$$

En ce qui concerne notre sujet, les 12 rats sont répartis en deux (2) groupes

Groupe 6 : les rats reçoivent une dose quotidienne de *Daflon* 60 mg/ kg pendant 7 jour après l'administration du *paracétamol* 100 mg / kg

Groupe 7 : les rats reçoivent une dose de *Daflon* 60 mg/ kg pendant 7 jour après l'administration du *paracétamol* 200 mg / kg

Groupe 6 :

$$\begin{array}{l} 60 \text{ mg} \longrightarrow 1 \text{ kg} \\ y_2 \longrightarrow 0,225 \text{ kg} \end{array} \qquad \text{Donc : } y_2 = 13,5 \text{ mg / rat}$$

Un rat de 0,225 kg reçoit 13,5 mg de *Daflon*

Le volume administré est 1 ml / rat, donc la préparation du médicament est :

$$\begin{array}{l} 13,5 \text{ mg} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\ 300 \text{ mg} \longrightarrow y_2' \end{array} \qquad \text{Donc : } y_2' = 22,2 \text{ ml de H}_2\text{O}$$

Groupe 7 :

$$\begin{array}{l} 60 \text{ mg} \longrightarrow 1 \text{ kg} \\ y_3 \longrightarrow 0,168 \text{ kg} \end{array} \qquad \text{Donc : } y_3 = 10,08 \text{ mg / rat}$$

Un rat de 0,168 kg reçoit 10,08 mg de *Daflon*

Le volume administré est 1 ml / rat, donc la préparation du médicament est :

$$\begin{array}{l} 10,08 \text{ mg} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\ 300 \text{ mg} \longrightarrow y_3' \end{array} \qquad \text{Donc : } y_3' = 30 \text{ ml de H}_2\text{O}$$

Les calculs des autres groupe peuvent être représentés dans le tableau suivant :

Groupe	Nombre des rats	Objectif	
1	6	Témoin	1ml de l'eau distillée
2	6	Etude de la tonicité hépatique du <i>paracétamol</i> 100 mg/kg et 200 mg/kg	Le <i>paracétamol</i> 100 mg/kg et administré quotidiennement pendant 3 jours.
3	6	//	Le <i>pacétamol</i> 200 mg/kg est administré quotidiennement pendant 3 jours
4	6	Etude de l'effet préventif de <i>Daflon</i> 60 mg/kg	Le <i>Daflon</i> 60 mg/kg est administré quotidiennement pendant 7 jours suivi d'une administration du <i>paracétamol</i> 100 mg/kg jusqu'au 10 ^{ème} jour
5	6	//	Le <i>Daflon</i> 60 mg/kg est administré quotidiennement pendant 7 jours suivi d'une administration du <i>paracétamol</i> 200 mg/kg jusqu'au 10 ^{ème} jour
6	6	Etude de l'effet curatif de <i>Daflon</i> 60 mg/kg	Le <i>paracétamol</i> 100 mg/kg et le <i>Daflon</i> 60 mg/Kg sont administrés quotidiennement pendant 3 jours, mais l'administration de <i>Daflon</i> est poursuivi jusqu'au 7 ^{ème} jour
7	6	//	Le même travail mais avec Le <i>paracétamol</i> à une dose de 200 mg/kg

• Voie d'administration

Le *paracétamol* (*Paralgon* 500 mg) et le *Daflon* 300 mg sont dissous dans l'eau distillée, puis administrés par gavage gastrique à l'aide d'une sonde métallique (B-D corn wall Beston, Dickinson and Co Made in USA)

• Réactifs et solutions

Les dosages étudiés ont été le *malondialdéhyde* (*MDA*) et les protéines tissulaires du foie :

Acide thiobarbiturique (TBA 0,67 %), trichloro-acetic (TCA : 20 %) n-Butanol et 1,1',3,3' tétraméthoxypropane (TMP) comme standard.

Pour les protéines tissulaires en utilisant le réactif de Biuret et de l'albumine 60 g/l comme standard, TCA (5%).

III-1-3. Prélèvement des échantillons

Les prélèvements sont effectués 24-72 heures et 7 jours après d'administration des médicaments (*Paralgan* et *Daflon*).

• Prélèvement du foie

Un rat de chaque lot est sacrifié après anesthésie à l'éther aux délais de 24 et 72 heures et deux rats de chaque groupe pour le délai de 7 jours. Après la paratomie abdominale, le foie est lavé *insitu* par injection d'une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline) dans l'aorte abdominale à l'aide d'un cathéter en trois fragments : un fixé au boin pour l'histologie, un broyé immédiatement après pour la préparation de l'homogénat et le reste congelé pour des dosages ultérieurs.

III-2. Méthodes

• L'étude toxicologique

La toxicité s'intéresse aux besoins morphologiques et fonctionnelles résultant des substances chimiques ou non dans l'organisme vivant.

• Préparation des solutions pour 1 g de foie

KCL : 1,15 mol :

$$\begin{array}{l} 74,5 \text{ g} \longrightarrow 1 \text{ mol} \\ x \longrightarrow 1,15 \text{ mol} \end{array} \quad \text{Donc : } x = 85,67 \text{ g}$$

Pour le 1 g de foie d'un rat nécessite 3 ml de Kcl (1,15 M) :

$$\begin{array}{l} 85,67 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \\ x' \longrightarrow 3 \text{ ml} \end{array} \quad \text{Donc : } x' = 0,26 \text{ g de Kcl}$$

On dissout 0,26 g de Kcl dans 3 ml d'eau distillée (Trichloro-acetic (TCA 20 %))

$$\begin{array}{l} 20 \text{ g} \longrightarrow 100 \text{ ml} \\ y \longrightarrow 0,5 \text{ ml} \end{array} \quad \text{Donc : } y = 0,1 \text{ g de TCA}$$

On dissout 0,1 g de TCA dans 0,5 ml d'eau distillée (Trichloro-acetic 5 %)

$$\begin{array}{l} 5 \text{ g} \longrightarrow 100 \text{ ml} \\ z \longrightarrow 0,5 \text{ ml} \end{array} \quad \text{Donc : } z = 0,025 \text{ g de TCA}$$

Acide thiobarbiturique TBA (0,67 %)

$$\begin{array}{l} 0,67 \text{ g} \longrightarrow 100 \text{ ml} \\ y' \longrightarrow 0,5 \text{ ml} \end{array} \quad \text{Donc : } y' = 0,0035 \text{ g de TBA}$$

La solution standard des protéines :

La concentration de l'albumine = 60 g/l

60 g ———> 100 ml

0,1 g ———> z' ml

Donc : z' = 1,66 ml de H₂O

• **Préparation des Homogénats**

Pour le dosage de l'MDA nous avons utilisés 1g de foie additionné à 3 ml de solution de KCL (1,15 molaire) puis broyage par un homogénéiseur de DOUNCE (KONTES. Glass compary an ISO-9001 stered firm. New Jersey USA).

Il s'agit d'un cylindre en verre menu d'un piston "A" pour la cassure des parois cellulaires et un autres "B" pour une homogénéisation plus firme (8)

Pour le dosage des protéines tissulaires, nous avons utilisés 1g de foie additionné à 3 ml de TCA à 5% puis broyage jusqu'à la rupture des membranes cellulaires et l'obtention d'un homogénat.

• **Dosages tissulaires et biochimiques**

a) Dosage de malondialdehyle (MDA)

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) médiée par les radicaux libres.

Principe

Son dosage repose sur la formation en milieu acide et à chaud 100°C entre le MDA et deux thiobarbiturique (TBA) d'un pigment absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol, la réaction colorée observée avec l'acide thiobarbiturique (voir fig.(8))

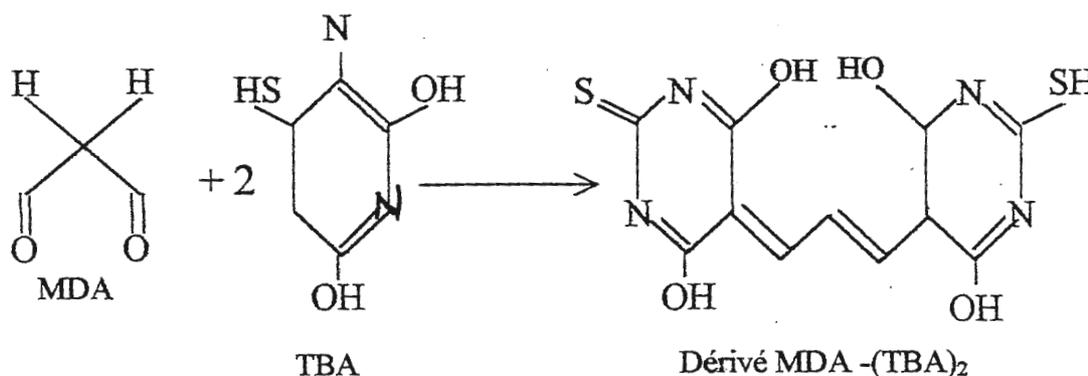
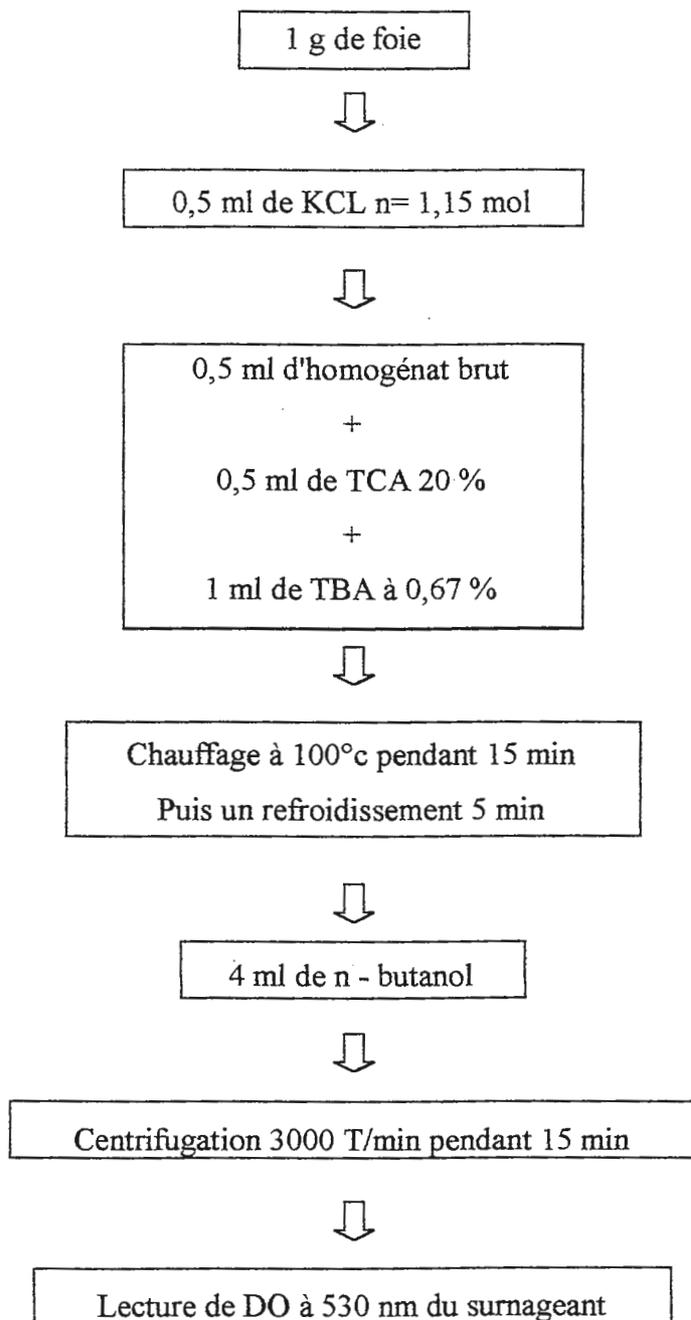


Fig (8) : Réaction entre Malondialdéhyde et thiobarbiturique (TBA) (25)

Mode opératoire

La préparation de l'homogénat et le dosage sont effectués selon la méthode Ohkawa et All 1979 et Kikugawa et All 1990 :



b) Dosage des protéines tissulaires

Les protéines tissulaires sont dosées par une méthode colorimétrique du Biuret

Les compositions chimiques de réactif Biuret :

Réactif 1	Réactif de Biuret
Soude 0,1 mol/l	- Tartrate de sodium et potassium 16 mmol/l - Iodure de potassium 15 mmol/l - Sulfate de cuivre 6 mmol/l
Réactif 2 Standard	Albumine 60 g/l

Principe

Les protéines forment avec les ions cuivriques Cu^{++} en milieu alcalin, un complexe bleu-violet

Le protocole du dosage est le suivant :

	Blanc	Étalon	Échantillon (Surnageant)
Standard	-	50×10^{-3} ml	-
Échantillon	-	-	50×10^{-3} ml
Réactif de travail	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

Le contenu des tubes est mélangé puis incubé pendant 30 min à $20^\circ\text{C} \rightarrow 25^\circ\text{C}$ et les concentrations des échantillons sont mesurées contre le blanc à l'aide du spectrophotomètre à une longueur d'onde 546 nm, la concentration exprimée en g/l est calculée comme suit :

$$\text{Protéines Totales} = \frac{\text{Densité optique échantillon}}{\text{Densité optique standard}} \times n / n = 60 \text{ g/l}$$

III-3. Evaluation statistique

Les résultats numériques et graphiques sont présentés sous forme de moyenne $\bar{X} \pm$ écart type (S)

Pour la comparaison des moyennes nous avons utilisé le test de Student. On doit calculer la valeur de t qui est donnée par la formule suivante :

$$t = \frac{\bar{X}_A - \bar{X}_B}{\sqrt{\frac{S^2}{N_A} + \frac{S^2}{N_B}}}$$

$\bar{X}_A - \bar{X}_B$: signifie la valeur absolue de la différence.

$\bar{X}_A - \bar{X}_B$: (\bar{X}_A : la moyenne pour paramètre A, \bar{X}_B pour un autre B).

$$S^2 = \frac{S^2_A(N_A - 1) + S^2_B(N_B - 1)}{(N_A - 1) + (N_B - 1)}$$

N : le nombre de mesure.

Après le calcul de t, nous avons cherché dans la table de t la valeur correspondante du degrés de liberté qui est égale à $N_A + N_B - 2$.

La valeur trouvée par le calcul du t peut affirmer que les populations diffèrent avec un risque d'erreur ϕ tel que :

- $\phi > 0,05$ = la différence n'est pas significative.
- $0,05 > \phi > 0,01$ = la différence est significative.
- $0,05 > \phi > 0,001$ = la différence est hautement significative.
- $\phi < 0,001$ = la différence est très hautement significative.

Chapitre IV

Les Résultats

IV- Résultats

Notre étude de l'effet des *Flavonoïdes* sur la *péroxydation lipidique* provoquée par le *paracétamol* à deux doses différentes (100 mg /kg / oral, et 200 mg/ kg/ oral), comporte une analyse biochimique.

En plus de l'étude de la toxicité aiguë pendant 3 jours, la toxicité subaiguë (entre 3^{ème} et 7^{ème} jours) est également faite.

IV-1. Variation des concentrations du malonyldialdhyde (MDA)

Tableau I : présente les variations de concentrations du MDA en fonction du temps chez les sept (7) groupes

Les groupes	Concentration du MDA / n molaire		
	24 H	72 H	7 ^{ème} jour
1	46,6	50,4	53,92 44,81
2	45,57	49,11	56,96 52,15
3	91,4	54,93	59,24 65,06 37,72 49,11
4	48,86	39,74	15,95 22,53
5	18,00	42,02	54,93 57,72
6	86,6	134,4	56,4 50,9
7	132,9	93,16	27,34 50,4

A partir du tableau ci-dessus, nous avons tiré les tableau II, III, IV et V pour l'étude préventive et curative des *flavonoïdes* au cours de l'intoxication par le *paracétamol* 100 et 200 mg/ kg / orale.

IV-1-1. Effet préventif des flavonoides au cours de l'intoxication par le paracétamol 100 mg/ kg/ orale :

L'évaluation des concentrations du MDA au cours du traitement par le Paracétamol seul 100mg/kg par voie orale ou associé aux flavonoides, sont données dans le tableau II.

Tableau II : Variation des concentrations du MDA (nano Molaire) chez les groupes 1, 4 et 2

	24 H	72 H	7 ^{ème} jour
Témoin (groupe 1)	46,6	50,4	49,4
Flavonoïde + Paracétamol (groupe 4)	48,86	39,74	19,24
Paracétamol seul (groupe 2)	45,57	49,4	54,55

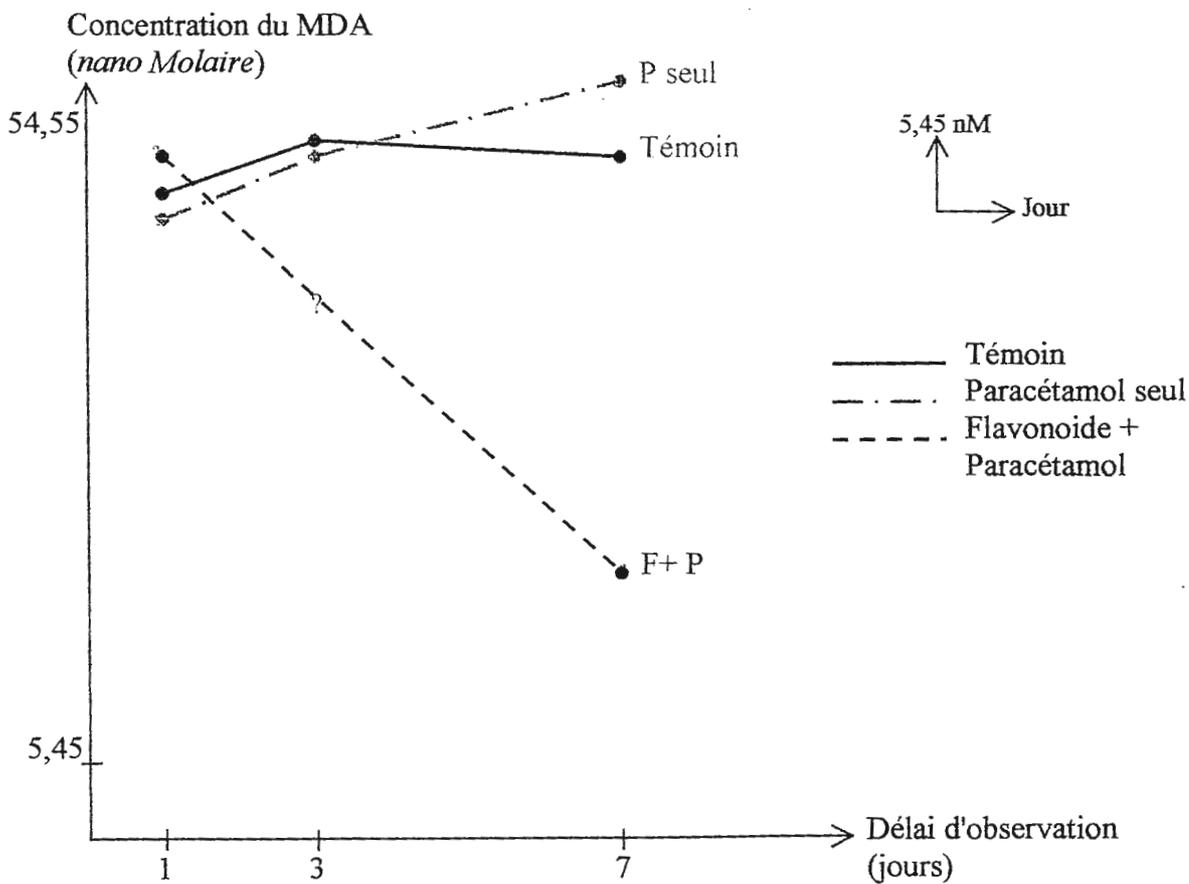


Fig (9) : Variation des concentrations du MDA en fonction du temps (100 mg/ kg du paracétamol)

Nous avons constatés une diminution continue en MDA chez les rats pré-traités par le "Daflon" et recevant également une dose du paracétamol pendant trois jours. Par contre, les rats traités par le paracétamol seul montrent une augmentation continue en MDA en fonction du temps par rapport au témoin.

IV-1-2. Effet préventif des flavonoides au cours de l'intoxication par le paracétamol 200 mg/ kg/ orale :

L'évaluation des concentrations du MDA au cours du traitement par le Paracétamol seul 200mg/kg par voie orale ou associé aux flavonoides, sont données dans le tableau III

Tableau III : Variation des concentrations du MDA (nM) chez les groupes 1,5 et 3

	24 H	72 H	7 ^{ème} jour
Témoin (groupe 1)	46,6	50,4	49,4
Flavonoïde + Paracétamol (groupe 5)	18	42,02	56,32
Paracétamol seul (groupe 3)	91,4	54,93	52,78

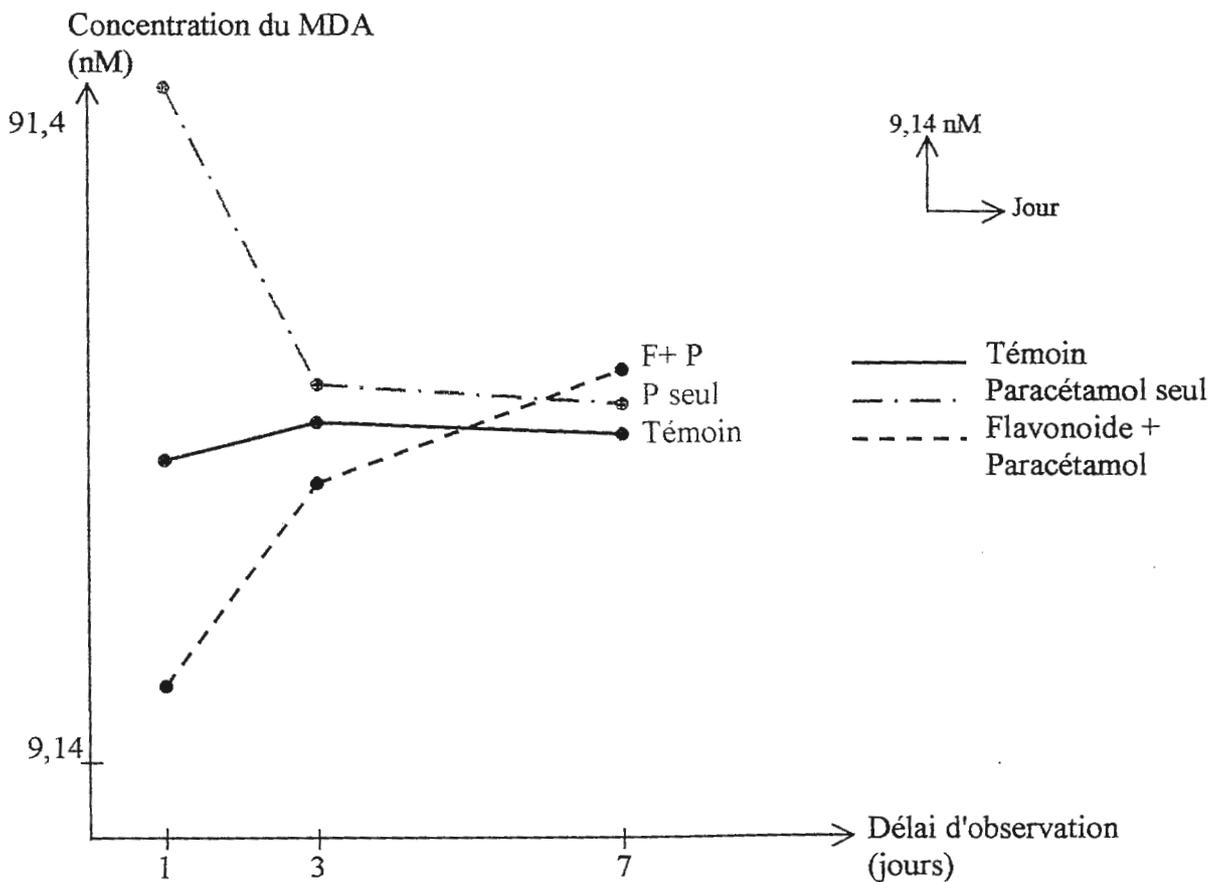


Fig (10) : Variation des concentrations du MDA en fonction du temps (200 mg/ kg du paracétamol)

Le traitement par *paracétamol* seul conduit à une diminution rapide en *MDA* en le 1^{er} et le 3^{ème} jours, mais nous avons observés une diminution modérée entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jours de mesures. Cependant, chez les rats traités par les *flavonoides* plus le *paracétamol* présentent une augmentation considérable en *MDA* dans un premier temps puis une augmentation modérée dans un 2^{ème} temps.

IV-1-3. Effet curatif des flavonoides au cours de l'intoxication par le paracétamol 100 mg/ kg/ orale :

L'évaluation des concentrations du MDA au cours du traitement par le Paracétamol seul 100mg/kg par voie orale ou associé aux flavonoides, sont données dans le tableau IV.

Tableau IV : Variation des concentrations du MDA (nM) chez les groupes 1, 6 et 2

	24 H	72 H	7 ^{ème} jour
Témoin (groupe 1)	46,6	50,4	49,4
Paracétamol + Flavonoïde (groupe 6)	86,6	134,4	53,65
Paracétamol seul (groupe 2)	45,57	49,4	54,55

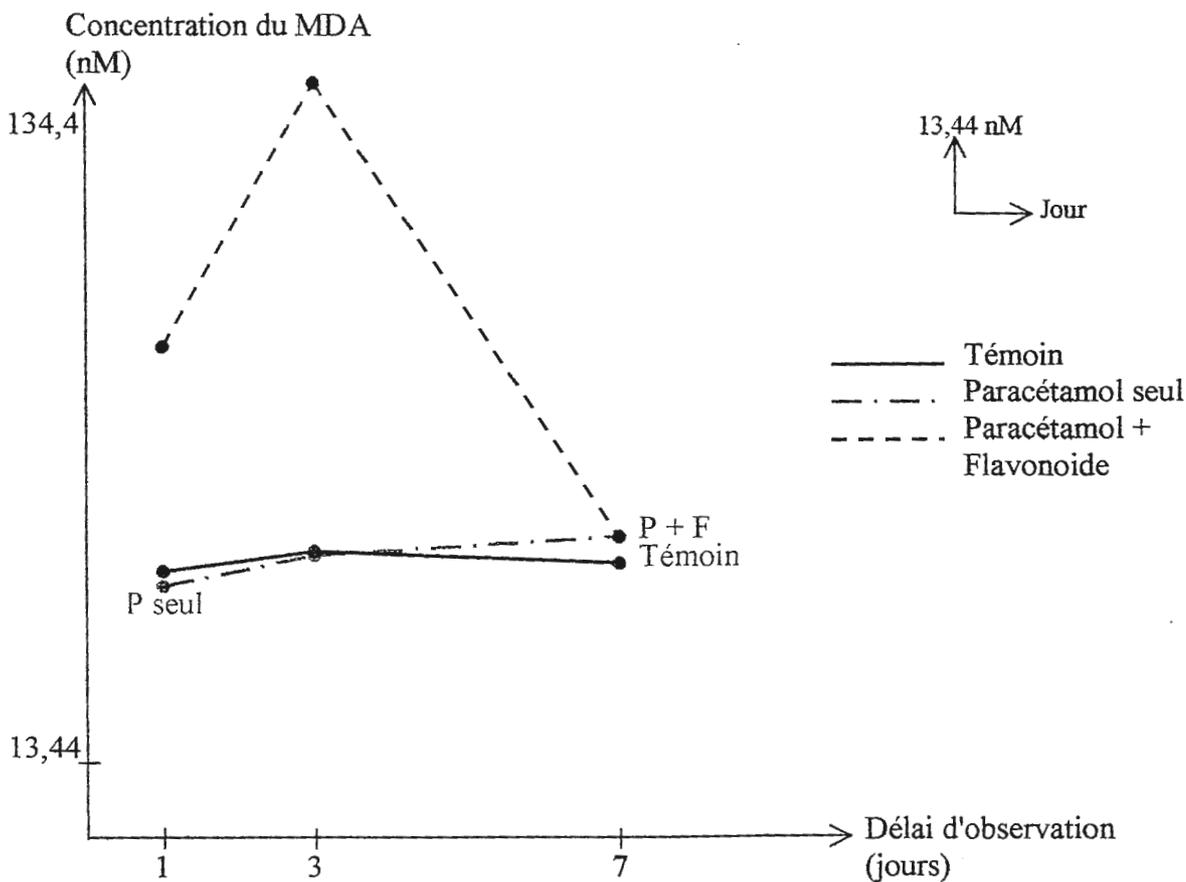


Fig (11) : Variation des concentrations du MDA en fonction du temps (100 mg/ kg du paracétamol)

Les animaux recevant en association le paracétamol et les flavonoides présentent une courbe subdivisée en deux phases; au cours de la première phase (entre le 1^{er} et le 3^{ème} jours), nous avons constaté une augmentation importante en MDA, il est également observé un retour progressif en MDA jusqu'à la valeur normale du témoin au cours de la phase deux (3^{ème} → 7^{ème}), cependant les animaux traités par le paracétamol seul désignent une variation légère en MDA par rapport au témoin.

IV-1-4. Effet curatif des flavonoïdes au cours de l'intoxication par le paracétamol 200 mg/ kg/ orale :

L'évaluation des concentrations du MDA au cours du traitement par le Paracétamol seul 200mg/kg par voie orale ou associé aux flavoïnoïdes, sont données dans le tableau V

Tableau V : Variation des concentrations du MDA (nM) chez les groupes 1,7 et 3

	24 H	72 H	7 ^{ème} jour
Témoin (groupe 1)	46,6	50,4	49,4
Paracétamol + Flavonoïde (groupe 7)	132,9	93,16	38,87
Paracétamol seul (groupe 3)	91,40	54,93	52,78

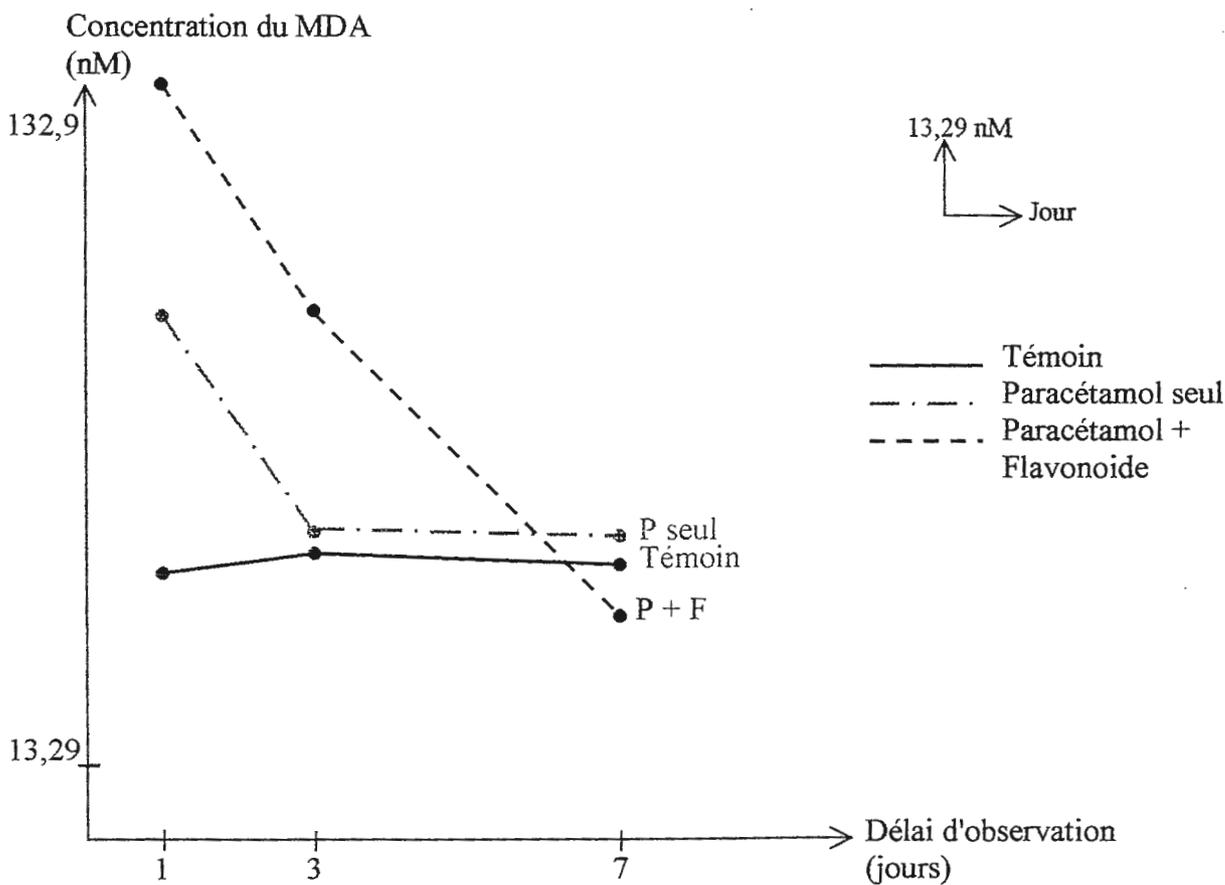


Fig (12) : Variation des concentrations du MDA en fonction du temps (200 mg/ kg du paracétamol)

Le graphe montre une chute en MDA jusqu'à une valeur moins de celle du témoin, chez les traités par le paracétamol et les flavonoïdes.

Ils est également observé une diminution sensible en MDA chez les traités par le paracétamol seul durant la 1^{ère} phase, cette diminution devient stable et présente une correspondance à une partie de la courbe du témoin durant la deuxième phase.

IV-2. Variation des protéines tissulaires :

Variation des concentrations des protéines tissulaires au cour du traitement par la Paracétamol seul 100 et 200 mg/kg/orale et en association avec le Daflon, sont représentées dans le tableau VI.

Le tableau VI : présente les variations des protéines tissulaires en g/l, en fonction du temps

Les groupes	Concentration des protéines tissulaires en g/l		
	24 H	72 H	7 ^{ème} jour
1	/	27,62	33,41
2	35,12	33,13	37,4
3	/	25	35
4	33,32	29,9	36,27
5	/	34,37	34,75
6	6,17	35,7	38,26
7	23,64	17,37	14,14

Le signe (/) signifie que la quantité de foie est insuffisante pour faire les mesures.

IV-3. Les calcules statistiques :

Le tableau VII : Résume les moyennes \pm les écart types de tous les groupes d'animaux étudiés du 7^{ème} jour

Les groupes	$\bar{X} \pm S$ du MDA du 7 ^{ème} jour
1	49,365 \pm 6,44
2	54,55 \pm 3,4
3	52,78 \pm 12,01
4	19,24 \pm 4,65
5	56,32 \pm 1,97
6	53,65 \pm 3,88
7	38,87 \pm 16,30



Chapitre V

Discussion

V- DISCUSSION

Chaque médicament est potentiellement toxique. La toxicité est souvent liée à la *bio-transformation* et par conséquent la production de *métabolites réactifs*. la quantité de métabolites formés liée à la dose du médicament utilisé potentialise aussi le risque toxique. C'est le cas du *paracétamol*, un dérivé des anilides très employé en clinique pour ses effets analgésiques et antipyrétiques.

En effet, il est reconnu aujourd'hui que le *paracétamol* est un antalgique dangereusement hépatotoxique [BENCKEIKH et coll. .,2000]. Il provoque dans cet organe une nécrose fulgurante causée par un métabolite formé par le *cytochrome P450* [ETIENNE F et coll. ,1993].

C'est au cours du métabolisme du médicament reconnu comme *xénobiotique* que le système enzymatique de fonctionnalisation représenté par le groupe de *cytochrome P-450* intervient.(6). Il permet d'amorcer le processus d'élimination des composés indésirables. Cependant les métabolites qu'ils produisent peuvent être toxiques s'ils ne sont pas transformés rapidement et éliminés (16).

C'est ainsi que le *paracétamol* est métabolisé par le *Cyt P-450* pour donner un métabolite réactif (N-acétyl-P-benzoquinone Imine) Ce métabolite réactif va réagir aux macromolécules cellulaires (lipides, ADN) en endommageant les structures cellulaires et conduisant à la *nécrose* (21).

En effet, il est clairement démontré aujourd'hui que les *radicaux libres* sont responsables d'un grand nombre de processus dégénératifs; accélérant le vieillissement des tissus. Les altérations par les *radicaux libres* des parois cellulaires sont à l'origine des affections des artères et du cœur telles que l'atérosclérose et l'infarctus.

Le *stress oxydatif* entraîne des maladies neurovégétatives comme la maladie de Parkinson, le cataracte et l'arthrite. Quand aux lésions de l'ADN cellulaire, elles sont responsables de certains cancers liés à l'âge (23)

La *péroxydation lipidique* survient lorsqu'il existe un déséquilibre entre la formation et la *détoxication* des *métabolites réactifs*, ceci peut être lié soit à une hyper-production des *métabolites réactifs*, un défaut de *détoxication*, ou à l'association des deux (21).

En générale, la *péroxydation lipidique* entraîne des perturbations de la microarchitecture membranaire, altère les fonctions des enzymes, transporteurs et perméabilité membranaires(31) et par conséquent le vieillissement et la nécrose cellulaire (9). Les *flavonoïdes* permettent de prévenir ces processus toxiques.

L'un des tests employé pour évaluer cette *péroxydation lipidique* est le dosage du *malonyldialdéhyde* (MDA). On note souvent une augmentation des taux de *MDA* au cours de la peroxydation.

Dans notre étude consacrée à l'évaluation du risque de peroxydation secondaire à un traitement par le *paracétamol* à différentes doses 100 et 200mg/kg. La toxicité est suivie pendant une période de 7 jours. Nous avons remarqué une augmentation significative des taux de *MDA* dans les groupes recevant le *paracétamol* seul. Elle est plus grande pour la dose de 200mg/kg.

En ce qui concerne l'étude de l'effet des *flavonoïdes* sur la toxicité du *paracétamol*, nous avons testé le *Daflon* 300mg que nous avons administré par voie orale à la dose thérapeutique de 60mg/kg. Le *Daflon* est administré soit avant le *paracétamol* soit après.

Pour rappel, les *flavonoïdes* ont une capacité à piéger et neutraliser les *radicaux libres*. Cette capacité est liée à leur structure qui permet la fixation de deux atomes d'hydrogènes fournis par les deux fonction phénol (20).

Les résultats de notre étude sont en parfaite corrélation avec ceux de la littérature. En effet, nous avons remarqué une nette diminution des taux de *MDA* dans les groupes d'animaux recevant le *Daflon* avant le *paracetamol*. Ceci montre l'effet préventif des *flavonoïdes* sur la toxicité du *paracétamol*. Ce dernier n'a pas fait l'objet d'étude approfondie et nous considérons que nos résultats sont originaux.

De plus, la cellule dispose pour sa protection du *glutathion* [LAHOUEL M et coll.,1998] qui a pour fonction de neutraliser des substances toxiques qui pénètrent dans l'organisme.

Nos résultats sont également corrélés avec ceux du dosage du *glutathion* obtenus par un groupe du laboratoire.

En effet, dans une étude menée en parallèle avec la notre par un groupe il a été montré que : les taux du *glutathion* obtenus chez les rats prétraités par le *Dalfon* (60 mg/kg) sont supérieurs à ceux du témoin pendant les 3 jours suivant l'administration du *Paracétamol* (100 et 200 mg/kg).

Par contre les taux du *glutathion* chez les rats qui reçoivent le *Paracétamol* seul et le *Paracétamol +Dalfon* sont inférieurs à ceux du témoin. Cette diminution (perturbation du taux du *glutathion*) est certainement due à l'action toxique du *Paracétamol* et la production des métabolites instables (toxiques). Qui sont fixés par le *glutathion* et provoquent alors la diminution des taux du *glutathion*.

Le *glutathion* exécute plusieurs tâches essentielles dans l'organisme : c'est le principal antioxydant propre de la cellule (37), en outre la plupart des réactions connues en toxicologie sont de type « *détoxication* », le « *GSH* » se liant par son pôle —SH aux *Xénobiotiques* ou a un métabolite toxique (agent nucléophile) l'exemple le plus démonstratif étant l'intoxication au *paracétamol* dont la toxicité hépatique n'apparaît qu'avec la déplétion du foie en *glutathion*(5)

Les biens faits pour notre santé des *flavonoïdes* semblent être étroitement liés à leurs exceptionnelle capacité à piéger et neutraliser les *radicaux libres* et donc submerger les différences naturelles de l'organisme, cette capacité est liée à leur structure qui permet la fixation de deux atomes d'hydrogènes fournis par les deux fonction phénol (20).

En revanche, le traitement par le *Daflon* conduit à une diarrhée intense chez les rats du 7^{ème} groupe observée après 24^H et 72^H. ce qui corrige les information écrites sur la notice du *Daflon* ; le *Daflon* n'a aucun effet secondaire.

Chapitre VI

Conclusion

Conclusion :

Aujourd'hui, le *paracétamol* reste l'antalgique le plus utilisé en raison de ses effets indésirables négligés et ignorés. Mais, notre étude sur l'hépatotoxicité du *paracétamol*, leur effet sur la *péroxydation lipidique* en cas d'utilisation seul et en association avec le *Daflon*, nous a permis de dégager les conclusions suivantes :

- La *péroxydation lipidique* et le taux du *MDA* au cours de l'intoxication par le *paracétamol* est dose dépendante.
- Les *métabolites réactifs* formés au cours de la *biotransformation* du *paracétamol* - qui sont à l'origine de l'augmentation du *MDA*- sont *détoxifier* par le *glutathion*. Mais, en cas d'une déplétion du foie en ce dernier (*le glutathion*), le *Daflon* peut jouer le rôle d'un antioxydant exogène.
- Nous avons noté aussi que le *Daflon* possède un effet préventif beaucoup plus que curatif.

Afin de mieux comprendre l'effet du *paracétamol* et celui du *Daflon*, une étude approfondie est souhaitable où des doses plus élevées du *paracétamol* sur des périodes assez longues doivent être étudiées.

Chapitre VII

Bibliographie

- 1- AIACHE. J.M. 1983
Biopharmacie Galénicas
Technique et documentation II, 2^{ème} EDITION
- 2- Arnaud Basdevant, Martine Laville et Eric Lerebours 2002
Traite de nutrition chimique de l'adulte
Médecine - Science flammariion,
- 3- Bouvenot. G, Devulder.B, Guillevin. L et Queneau. P 1995
Pathologie médical
Masson Editeur, TOME 3
- 4- Boutelet - D.E.A 1985
Biologie moléculaire et cellulaire
Université de Rouen (France).
- 5- Etienne Fournier 1993
Toxicologie
© copyright 1993, EDITION Marketing
- 6- Francesco Dematteis 1994
Contaminants in the environment
by CRC PRSS INC
- 7- Frank C.LU 1992
Toxicologie, données générales
EDITION Masson
- 8- Fisher 2002
Bioblock Scientific
F- 67403 illkirch Cedex France
- 9- Guy Leyal - Elisabeth Vierling 2001
Microbiologie et toxicologie des aliment (p 245, 253)
3^{ème} EDITION
- 10- Jean pierre Benhanou et Serge Erlinger 2000
Maladies du foie et des voies biliaires
Médecine - Science flammariion, 4^{ème} EDITION

NOM	PRENOM	DATE DE SOUTENANCE
ROUBAH	Hassiba	29 Juin 2003
DOUKHANE	Nadjete	
BOUCHINA	Rekia	

**EVALUATION DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE AU COURS DU TRAITEMENT
PAR LE PARACETAMOL SEUL OU ASSOCIE AUX FLAVONOIDES**

Nature du diplôme: **Diplôme d'étude Supérieure (D.E.S)**
Biochimie

RESUME

Le paracétamol est un antalgique largement utilisé. Seulement il est hépatotoxique au delà d'une dose de seuil (300 mg/ kg). Sa toxicité est due à un métabolite issu de sa transformation dans le foie par le Cytochrome P-450 : le N - ACETYL - P- BENZOQUINONE - IMINE. ce dernier réagit avec les lipides membranaires entraînant des nécroses. L'évaluation du taux du MDA permet d'apprécier cette toxicité.
Dans notre étude réalisée sur les rats WISTAR, nous avons étudié l'effet du paracétamol aux doses de 100 et 200 mg/kg/orale en présence et en absence du Daflon 300mg/kg qui sont des antioxydants.
Les résultats montrent une élévation des taux du MDA au cours du traitement par le paracétamol seul.
Par contre ces taux se trouvent diminués en cas d'administration du Daflon. Cette diminution est plus marquée en traitement préventif qu'en traitement curatif. Les Flavonoïdes ont un effet antioxydant préventif.

SUMMARY

The paracétamol is extensively an antalgique uses only it is hépatotoxique to the of the a dose only (300mg/kg). Its toxicity is owed to a metabolite descended of her transformation in the liver by Cytochrome p-450: the N-Acetyle-P-benzoquinone-Imine, this last reacts with the lipid lively membranaires of necroses, the assessment of two of the MDA permits to appreciate this toxicity. In our survey achieved on the WISTARS rats we studied the effect of paracétamol to doses of 100 and 200mg/kg/orals in presence or absence of flavonoides Daflon (300 mg/kg) that are Antioxidants. Results bring up an elevation of rates of the MDA on the ther hand during the treatment by the alone paracétamol these rates are decrease in case of administration of Daflon this reduction is marked more in preventive treatment that in curative treatment. Flavonoideses have an effect preventive antioxidant.

المخلص

البراسيتامول مسكن للألام، واسع الإستعمال إلا أنه يؤدي إلى تسمم كبدى انطلاقا من جرعة العتبة (300 مغ/كغ)، سميته ناتجة عن تحويله بواسطة السيتوكروم P-450 إلى مركب فعال هو N-أستيل-P-بنزوكينون-إمين. هذا الأخير يتفاعل مع الليبيدات الغشائية مؤديا إلى تعفن الكبد.
يقدر هذا التسمم بقياس معدل المالونيل ثنائى الألدهيد وهو الهدف الأساسى فى عملنا التطبيقي المنجز على مجموعة من الفئران من نوع 'وسطر'، حيث قمنا بدراسة تأثير البراسيتامول بالجرعة 100 و 200 مغ/كغ فى وجود وغياب الفلافونويدات التى تعتبر مضادات للأكسدة فتؤدي إلى انخفاض معدل المالونيل ثنائى الألدهيد فى الحالة الوقائية أكبر بكثير مما تكون عليه فى الحالة العلاجية.

Mots Clés

Paracetamol, hépatotoxique, Cytochrome P-450, Nécroses, MDA, Daflon, Flavonoïdes, Préventif, Curatif

Laboratoire de Recherche - Institut de biologie - Jijel
Directeur de Recherche : **Dr LAHOUEL Mesbah**