

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche SCIENTIFIQUE

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل
Université Mohammed Seddik Benyahia - Jijel



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Moléculaire et Cellulaire

كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم : بيوكيمياء و بيولوجيا جزيئية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Biologie

Option : Biochimie

Thème

Evaluation de stress oxydatif induit par certains médicaments potentiellement génotoxiques chez la ratte gestantes

Membres de Jury

- Présidente : Dr. BOUHAFS Leila
- Examinatrice : Dr. BENGUEDOUAR Lamia
- Encadreur : Pr. LAHOUEL Mesbah

Présenté par :

- SOUIADE Mohammed Hamdi
- MESSAHEL Nabila

Année Universitaire 2017-2018

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

REMERCIEMENT

Toute chose, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

A notre promoteur de mémoire,

Professeur LAHOUEL.M

Cher maître, Nous sommes très touchés par la gentillesse avec laquelle vous nous avez toujours reçus. Vos conseils et la clarté de vos enseignements font de vous un maître respectable. Veuillez croire cher maître, en l'expression de notre profonde gratitude.

A notre codirecteur de mémoire,

Docteur BOUMESLAT.K

Cher maître, nous vous remercions pour la confiance que vous nous faites en nous confiant ce travail. Nous avons pu apprécier pendant cette période pour votre service, vos conseils, votre simplicité, votre modestie surmontée d'un bon sens élevé de sociabilité, cher maître, en cet instant solennel, nous vous prions d'accepter l'expression de notre profonde gratitude.

A notre présidente du jury de mémoire,

Docteur BOUHAFS.L

Cher maître, c'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant la présidence de ce jury. Nous avons pu apprécier la qualité de vos enseignements et vos qualités intellectuelles font de vous un maître exemplaire. Veuillez accepter cher maître toute notre reconnaissance.

A notre examinatrice de mémoire,

Docteur BENGUEDOUAR.L

Cher maître, nous avons été très séduits par votre amabilité, votre gentillesse. Vos qualités intellectuelles et vos capacités pédagogiques sûres font de vous un modèle de maître souhaité par tout étudiant. En témoignage de notre reconnaissance infinie, nous vous prions cher maître, d'accepter l'expression de notre gratitude.

Aux ingénieurs des laboratoires,

Nous tenons à remercier profondément, Les ingénieurs du laboratoire de Toxicologie Moléculaire, Université de Jijel, et de laboratoire pédagogique de la faculté de SNV surtout Mr. Kherat Mokhtar pour l'attention qu'ils ont porté à notre travail et surtout pour leurs supports techniques et ses encouragements, Un grand merci à tous les enseignants du département des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Jijel.

Nous tenons à remercier profondément l'équipe de CRD Saidal, pour l'attention qu'ils ont porté à ce travail, leurs supports et ses encouragements.

Nous remercions enfin tous ceux qui nous ont rendu service et qui ont contribué de près ou de loin pour accomplir ce travail.

Dédicaces

J'offre ce travail à ma famille et surtout mes chère parents: ma chère mère ,Ouarda et mon cher père Salah qui m'ont aidé à être ce que je suis, avec tant d'amour et d'affection.

A mon cher frère: ABOUBAKR

A ma chère soeur : LILIA

Pour l'affection qui nous lie, pour l'intérêt que vous portez à ma vie, pour vos soutiens, vos compréhensions et vos encouragements, Que ce travail soit le témoin de la reconnaissance infinie.

A tous ceux qui porte le nom de famille souiade.

A mes amis (e) surtout Ahmed, Tahar, Houssam, Seif-eddine, Abdessamad, Bidjad et
Reda.

A tous les étudiants (e) de ma promotion. Surtout Ibrahim, Amir, Ishaq, Imad, El-Arbi, Hamza, Sofiane, Anis, Amir et Mehdi.

Sans oublier mon binôme: NABILA

A toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire.

Med HAMD1

Dédicaces

J'offre ce travail à ma famille et surtout mes chère parents: ma mère YAMINA et mon père AMMAR qui m'ont aidé à être ce que je suis, avec tant d'amour et d'affection.

A toutes mes chères soeurs: FATIHA, SIHEM, MERIEM, DANIA

A tous mes chers frères: AZIZ, MOHAMED, MESSAOUD, ALI

A tous mes chères amies: IMANE, HANANE, BOUCHRA, RIMA

Pour l'affection qui nous lie, pour l'intérêt que vous portez à ma vie, pour vos soutiens, vos compréhensions et vos encouragements, Que ce travail soit le témoin de la reconnaissance infinie.

A tous les étudiants (e) de ma promotion

Sans oublier mon binôme: Med HAMD1

A toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire.

NABILA

Liste des figures :

Figure 1 :	Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.....	2
Figure2 :	Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.....	3
Figure 3 :	Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.....	5
Figure 4 :	Les principaux radicaux libres et les mécanismes de détoxification.....	6
Figure 5 :	Schéma de système de défense antioxydant enzymatique et leurs réactions le piégeage des radicaux libres et l'oxyde d'hydrogène.....	7
Figure 6 :	Structures des tocophérols.....	9
Figure 7 :	Structure de l'Acide ascorbique.....	9
Figure 8 :	Les principaux effets du stress oxydatif induit par les médicaments dans les cellules.....	11
Figure 9 :	Mécanisme d'action d'hydrochlorothiazide.....	15
Figure 10 :	Photographie originale prise de prélèvement sanguin à travers le sinus rétro-orbital au niveau de l'œil.....	26
Figure 11 :	Principe de Dosage Malondialdéhyde	30
Figure 12 :	Principe du dosage de la GSH.....	32
Figure 13 :	La représentation graphique du poids des rates Wistar albinos avant et après le traitement par l'HCTZ (200mg/kg) et le cyclophosphamide (80 mg/kg)	34
Figure 14 :	Observations macroscopiques des anomalies au niveau des yeux et visage (A), de la rate (C), des glandes surrénales (D) et de l'utérus (E) chez les rattes traitées par HCTZ (200 mg/kg) et par le CP (80 mg/kg) respectivement.....	36
Figure 15 :	La représentation graphique de l'activité enzymatique de la SOD rénale des rates traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins.....	37
Figure 16 :	La représentation graphique de l'activité enzymatique de la SOD hépatique des rates traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins.....	38
Figure 17 :	Schéma proposé de l'observation de potentiel antioxydant provoqué par l'hydrochlorothiazide.....	39

Figure :18	La représentation graphique de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique rénale des rates traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins.....	39
Figure 19 :	La représentation graphique de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique des rates traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins.....	40
Figure 20 :	La représentation graphique du taux de MDA cytosolique rénale des rates traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins..... La représentation graphique du taux de MDA cytosolique hépatique des rates	41
Figure 21 :	traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins..... La représentation graphique du taux de GSH cytosolique rénal des rates traitées	42
Figure 22 :	par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins.....	43
Figure 23 :	La représentation graphique du taux de GSH cytosolique hépatique des rates traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins.....	44
Figure 24 :	La représentation graphique des concentrations de TGP sérique chez les rates traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins.....	46
Figure 25 :	Teneurs plasmatiques en triglycéride chez le groupe HCTZ (200mg/kg) et le groupe CP (80 mg/kg) en comparaison avec le groupe témoin.....	47
Figure 26 :	La représentation graphique du taux de la clairance de la créatinine des rates traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins.....	48
Figure 27 :	Observation microscopique d'une coupe histologique rénale des rates, indique des changements après traitement avec dose de l'HCTZ en comparaison avec le CP et le témoin (x40)	49
Figure 28 :	Observation microscopique d'une coupe histologique hépatique des rates, indique des changements après traitement avec dose de l'HCTZ en comparaison avec le CP et le témoin (x40)	50

Liste des abréviations :

ADN :	Acide désoxyribonucléotidique
AGPI :	Acides gras polyinsaturés
ALAT	Alanine aminotransférase
BSA :	Bovine serum albumin
CAT :	Catalase
CP :	Cyclophosphamide
CRD	Centre de recherche et de développement
DAP :	dihydroxiacétone phosphate
DFG	Débit de filtration glomérulaire
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
ERA :	Espèces réactives d'azote
GK :	Glycérol kinase
GPx :	Glutathion peroxydase
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion oxydé ou bisulfure de glutathion
GST :	Glutathion S transférase
HFD :	High fat diet
HDL :	Lipoprotéine de haute densité
HCTZ :	Hydrochlorothiazide
IP :	Intrapéritonéale
LDH :	Lactate-déshydrogénase
LPL	Lipoprotéine Lipase
MDA :	Malondialdéhyde
ROS :	Reactive Oxygen Species
SOD :	Superoxyde dismutase
TBA :	Thiobarbituriques
TCA :	Acide trichloracétique
TEP :	tétraetoxypropane
TGP :	Transaminase glutamate-pyruvate

Glossaire

La maladie de Ménière	Elle se caractérise par des crises récurrentes de vertige qui s'accompagnent de sifflements et de bourdonnements d'oreilles (acouphènes) et d'une baisse d'audition. Le plus souvent, une seule oreille est atteinte. Il s'agit d'une maladie chronique.
Exophtalmie	est une extrusion antérieure de l'œil hors de l'orbite. L'exophtalmie peut être soit bilatérale (comme cela se rencontre en cas de maladie de Graves-Basedow) soit unilatérale (comme en cas de tumeur de l'orbite)
Chromodacryorrhée	Elle est provoquée par un pigment (la porphyrine) sécrété par la glande de Harder qui donne une coloration rouge aux larmes suite à une surproduction dans le cas d'un stress
Œdème	Il correspond au gonflement d'un organe ou d'un tissu dû à une accumulation ou un excès intra tissulaire de liquides dans l'interstitiel chez les animaux ou dans les cellules chez les végétaux. L'œdème peut être dû à de nombreuses causes primitives.
Splénomégalie	Une augmentation de volume (« -mégalie ») de la rate (« spléno- »). Ceci est repérable à la palpation ou à l'échographie.

SOMMAIRE

Introduction	
Analyse bibliographique	1
Chapitre 1: le stress oxydatif	2
1. Généralités sur le stress oxydatif.....	2
1.1.Les radicaux libres.....	3
1.1.1 Sources cellulaires des radicaux libres.....	3
1.1.2 Différentes formes de radicaux libres.....	5
1.2.Le système de défense contre les ROS: les antioxydants.....	6
1.2.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques.....	6
1.2.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques.....	8
1.3.Dégâts cellulaires.....	9
1.3.1. La peroxydation lipidique.....	10
1.3.2. Oxydation des proteines.....	10
1.3.3. Dommages de l'ADN.....	10
1.4.Stress oxydatif induit par les médicaments.....	11
Chapitre 2: Hydrochlorothiazide	
1. Généralités sur l'hydrochlorothiazide	12
2. Structure et origine.....	12
2.1.Description de HCTZ.....	12
2.2.Les propriétés de l'hydrochlorothiazide.....	13
3. Pharmacocinétique et Pharmacodynamique.....	14
3.1. Pharmacocinétique.....	14
3.2. Pharmacodynamie.....	15
4. Toxicité et effets secondaires.....	16
Chapitre 3: Cyclophosphamide	
1. Généralités sur le cyclophosphamide.....	19
2. Pharmacocinétique du cyclophosphamide	21
2.1.Administration et distribution du cyclophosphamide.....	21
2.2.Métabolisme du cyclophosphamide	21
2.3.Elimination du cyclophosphamide.....	22
3. La dose thérapeutique et effets secondaires du cyclophosphamide.....	23
Chapitre 4: Matériel et méthodes	
1. Matériel	
1.1.Produits chimiques.....	24
1.2.Matériel biologique.....	24

1.2.1. Entretien des animaux.....	24
1.2.2. L'accouplement des animaux.....	24
1.2.3. Traitement des animaux.....	24
1.2.4. Prélèvement sanguin.....	25
1.2.5. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes	26
2. Méthodes	26
2.1. Dosage des paramètres biochimiques	
– Mesure de l'activité des transaminases glutamate-pyruvate (TGP)	27
– Dosage de triglycérides.....	28
– Dosage de la créatinine plasmatique et urinaire	28
2.2. Exploration du stress oxydant	
2.2.1. Préparation de la fraction cytosolique	29
2.2.2. Dosage tissulaire des Protéines totales	29
2.2.3. Dosage du MDA cytosolique.....	30
2.2.4. Mesure de la SOD	30
2.2.5. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)	31
2.2.6. Dosage du glutathion cytosolique.....	32
2.3. Etude histologique	33
Chapitre 5: Résultats et discussion	
1. Évolution pondérale des animaux.....	34
2. Observations macroscopiques.....	36
3. Influence de l'HCTZ sur la fonction rénale et hépatique.....	37
3.1.Evaluation de l'activité enzymatique de superoxyde dismutase rénale et hépatique	37
3.2.Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique rénale et hépatique.....	39
3.3.Evaluation de la peroxydation lipidique rénale et hépatique	41
3.4.Evaluation du taux du glutathion (GSH) rénale et hépatique	43
4. Evaluation des paramètres biochimiques du sang.....	45
5. Résultats de l'étude histologique.....	49
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annexes	



INTRODUCTION

Introduction

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, mais susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Le stress oxydatif se définit ainsi comme un déséquilibre profond de la balance entre les ROS (espèces réactives de l'oxygène) et les antioxydants en faveur des premiers. Cette production excessive des ROS endommage les lipides, les protéines et l'ADN compromettant ainsi les fonctions cellulaires (Yu, 1994).

L'Hydrochlorothiazide est un diurétique appartenant à la classe des thiazides, il est utilisé pour traiter l'hypertension et les œdèmes (Herman and Bhimji., 2017).

Au-delà de ces actions thérapeutiques reconnues, l'hydrochlorothiazide présente un certain nombre d'effets secondaires notamment lors d'une utilisation prolongée à des doses élevées, la potentialisation des effets secondaires peut toucher plusieurs organes particulièrement le foie et le rein et même le cerveau (Ribeiro et *al.*, 2009, Ribeiro et *al.*, 2013).

Dans ce contexte nous avons jugé utile d'étudier les effets d'une utilisation prolongée de l'hydrochlorothiazide, à évaluer le stress oxydatif engendré, qui pourrait être à l'origine des effets délétères du médicament.

Notre étude aura pour objectif la mise en évidence un modèle de la néphrotoxicité et de l'hépatotoxicité suite à une utilisation prolongée d'une dose élevée de l'hydrochlorothiazide, et ce, en se basant sur :

- L'évaluation des paramètres cytosoliques de stress oxydatif hépatique et rénal suite à une administration de l'hydrochlorothiazide.
- L'évaluation des paramètres cytosoliques de stress oxydatif hépatique et rénal induit par le cyclophosphamide utilisé dans cette étude comme un témoin positif.
- Un suivie de la TGP, les TG et de la clairance rénale (créatinine plasmatique et urinaire).



STRESS OXYDATIF

1. Généralités sur le stress oxydatif :

Notre organisme a besoin d'énergie pour son bon fonctionnement. Les cellules transforment les nutriments apportés par l'alimentation en énergie et en eau. Cette transformation génère environ 2% de molécules d'oxygène (Edeas, 2005). Les réactions d'oxydation sont des réactions habituelles et indispensables au sein de nos cellules, car elles contribuent au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. En effet, les réactions d'oxydation jouent un rôle important lors de nombreux processus biologiques qui visent à maintenir un équilibre ou à synthétiser des molécules indispensables. Le métabolisme cellulaire produit et utilise en permanence des espèces oxydantes, c'est le cas au cours de la respiration, où chaque cellule réduit notamment l'oxygène en eau (Inoue et *al.*, 2003). L'oxygène peut devenir un redoutable toxique. Il serait même l'une des causes majeures du vieillissement cellulaire favorisé par un déséquilibre entre la production des radicaux libres de l'oxygène et le système antioxydant de l'organisme. C'est ce qu'on appelle le stress oxydant (Sies, 1997).

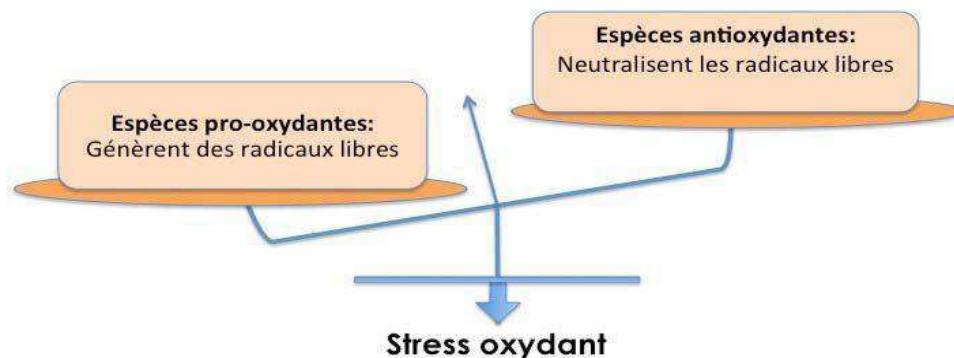


Figure 1 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants (Jennifer Baraka-Vidot, 2014)

Des molécules pro-oxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres (figure 01). Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant. (Christophe et Christophe., 2011. Papazian et Roch., 2008).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, le contact avec certains pesticides et solvants, la consommation de tabac et d'alcool, la prise de certains

médicaments, la pratique du sport intensif et tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante (Poirier., 2004 ; Massy., 2006).

1.1. Les radicaux libres

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des radicaux libres (RL). Un radical libre est une espèce chimique qui porte un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe (figure 02). La présence ou l'absence d'un électron donne une instabilité à ces molécules, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement réactives et que leur durée de vie est courte. (Carange, 2010)

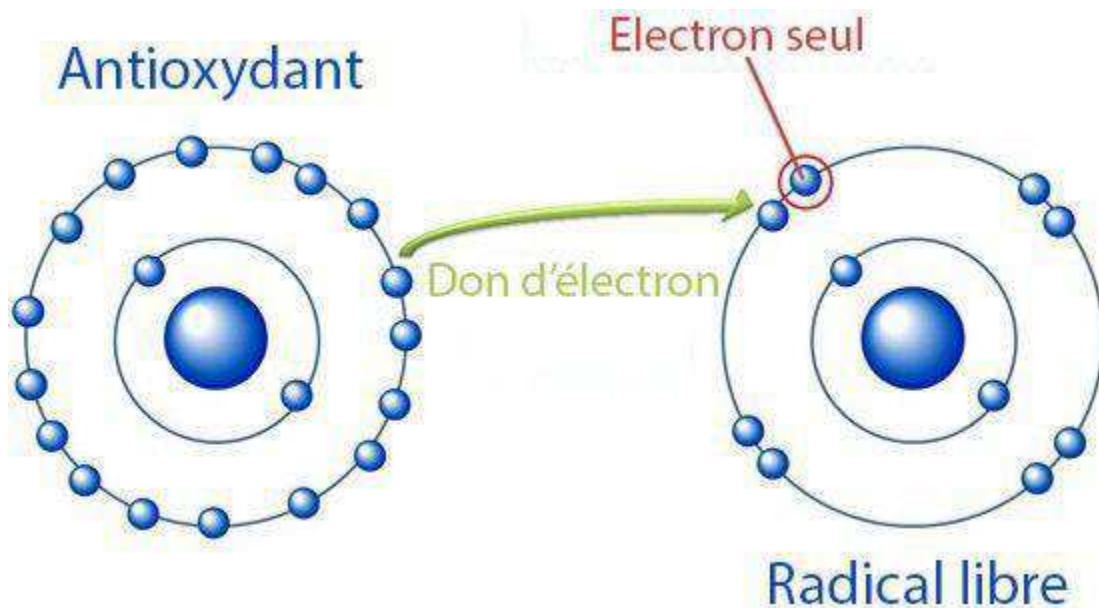


Figure 2 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant. (Carange, 2010)

Les radicaux libres agissent comme des accepteurs d'électrons et arrachent donc des électrons à d'autres molécules. Cette perte caractéristique d'un électron correspond au phénomène d'oxydation et les radicaux libres sont donc considérés comme des agents oxydants puisqu'ils incitent les molécules à donner des électrons (Gilgun et *al.*,

1.1.1. Sources cellulaires des radicaux libres

Dans l'organisme il y a de nombreuses sources des ROS dont l'importance varie selon les tissus. La réaction de Fenton produit des ROS dans la cellule. Les autres sources cellulaires des ROS sont enzymatiques et non enzymatiques (Droge, 2002). Parmi les sources des radicaux libres on peut citer :

a. La xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme soluble qui génère des ROS en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Harrison, 2002). Cette enzyme est

présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires et de façons très importantes dans le foie et les intestins. La localisation cellulaire de la xanthine oxydase est principalement cytoplasmique.

b. La NADPH oxydase

C'est une oxydase liée à la membrane plasmique. Elle joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes. En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d' $O_2^{\bullet -}$. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (Krause, 2004).

c. Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui ont un effet catalytique sur plusieurs réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (Freeman *et al.*, 1983 ; Turrens *et al.*, 1982). Le cytochrome P450 est parmi les enzymes majeurs qui oxydent les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS (Morel *et al.*, 1999). D'après les données précédentes il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum.

d. Les peroxysomes

Les peroxysomes sont une importante source de production d' H_2O_2 cellulaire. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d' H_2O_2 produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase. (Boveris *et al.*, 1972).

e. Les mitochondries

Elles constituent un système de transport énergétique au cours duquel l'énergie chimique contenue dans les aliments est transformée, par phosphorylation oxydative, en liaisons phosphate à haute énergie (ATP) (Robertis, 1983). Elles sont le siège majoritaire de la synthèse des radicaux superoxydes (Turrens, 1997 ; Guidot *et al.*, 1995). Durant la respiration, quatre électrons sont ajoutés à l'oxygène par le complexe IV de la chaîne respiratoire, cependant l'oxygène peut être réduit en formant des espèces réactives de l'oxygène telles que O_2^{\bullet} et OH^{\bullet} . La production de ces espèces réactives est nettement accélérée lors de la réduction du flux respiratoire notamment au cours des maladies génétiques (Lacolley, 2007).

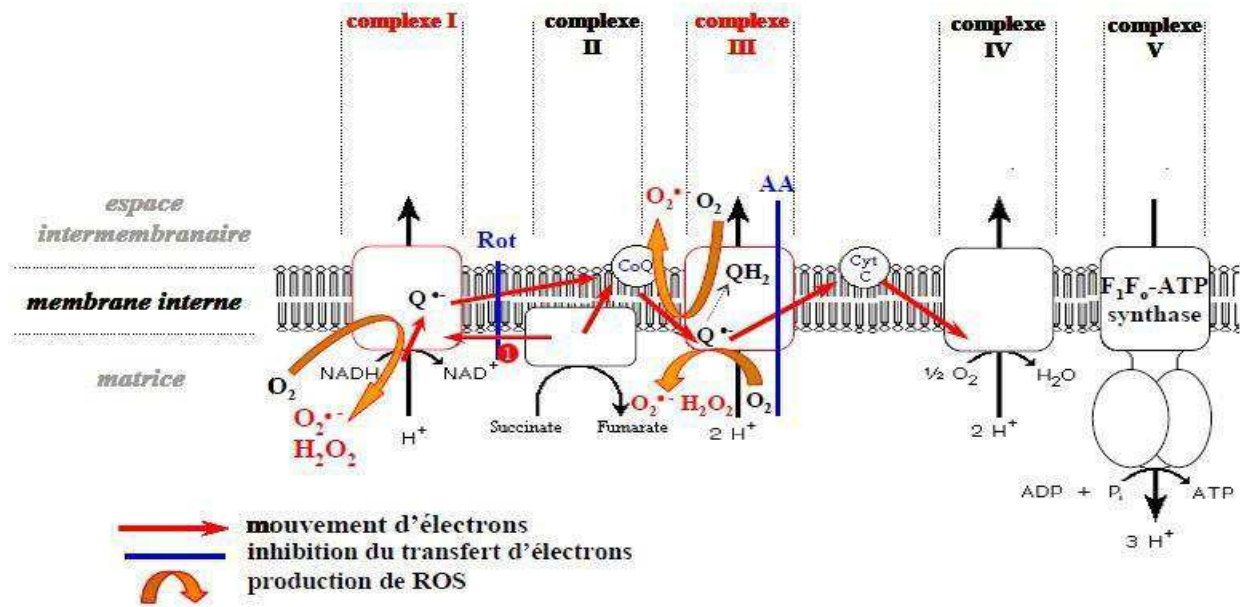


Figure 3 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.

([Http://www.biotech-ecolo.net](http://www.biotech-ecolo.net))

Deux sites de production d' $O_2^{\bullet-}$ sont reconnus : le complexe I et le complexe III. L'utilisation de la roténone (Rot) et de l'antimycine A (AA) a permis de localiser la production de ROS au niveau de ces complexes et de mettre en évidence le flux inverse d'électrons remontant du complexe II au complexe I.

1.1.2. Différentes formes des radicaux libres

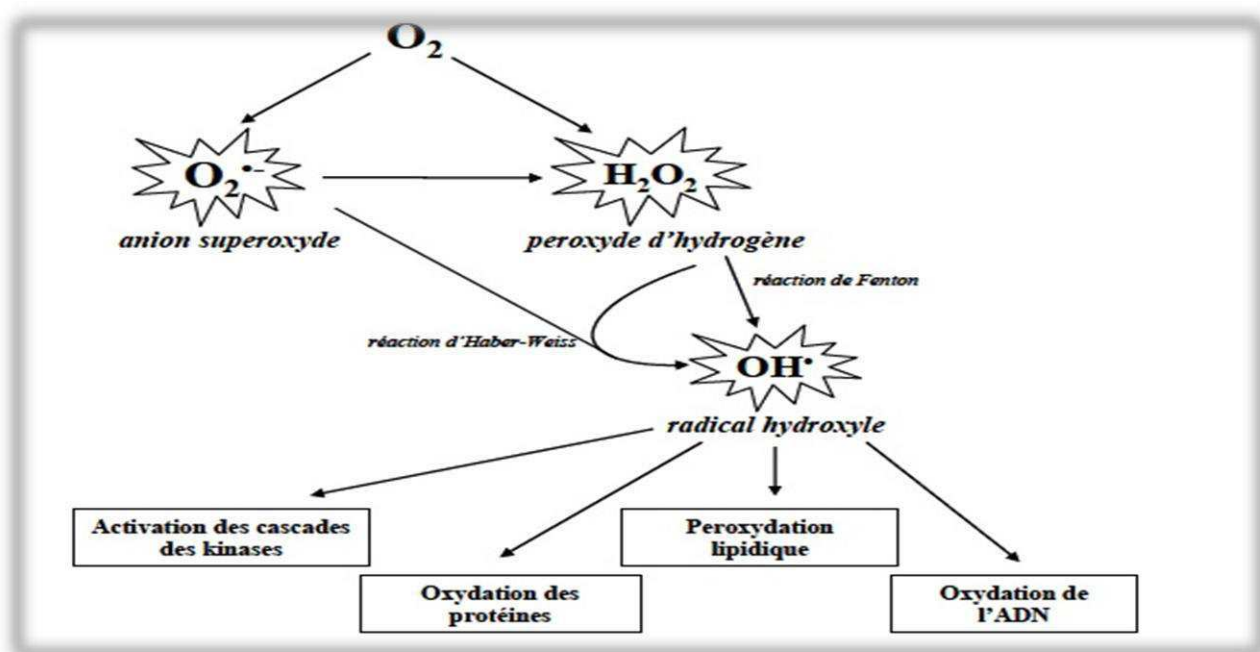
Les espèces réactives de l'oxygène comprennent non seulement les radicaux libres oxygénés mais aussi les radicaux libres dérivant d'autres espèces que l'oxygène par exemple : l'acide hypochloreux ($HClO$), le monoxyde d'azote NO^{\bullet} qui se combine aisément avec le $O_2^{\bullet-}$ pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Moussard, 2006).

Tout métabolisme cellulaire normal produit et utilise en permanence des espèces oxygénées réactives.

Les ROS sont générés par des radicaux libres, espèces chimiques neutres ou chargées, instables recherchant à récupérer un électron dans leurs environnements afin de retrouver un état plus stable. Les radicaux libres oxygénés ou espèces réactives de l'oxygène (ROS) constituent les principales espèces pro-oxydantes (Halliwell, 1994).

Tableau.1 Les principales espèces ROS et RAS générées dans les systèmes biologiques.

Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$
Radical hydroxyle	OH^{\bullet}
Monoxyde d'azote	NO^{\bullet}
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochlorique	$HOCl$
Peroxynitrite	$ONOO^-$
Radical peroxy	ROO^-


Figure 4. Les principaux radicaux libres et les mécanismes de detoxification. (Rondeau, 2009)

1.2. Le système de défense contre les ROS : les antioxydants

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression de ces oxydants grâce à divers mécanismes de défense tant enzymatiques que non enzymatiques. Les espèces antioxydantes peuvent se définir comme des substances qui sont capables de neutraliser les formes actives de l'oxygène et qui permettent de maintenir, au niveau de la cellule et de l'organisme, des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres. Un antioxydant possède différents modes d'action : il peut stopper des réactions radicalaires en chaînes (anti-radicalaire), inhiber des enzymes oxydantes spécifiques,

ou réagir avec des substances oxydantes avant qu'elles n'endommagent les molécules biologiques (Halliwell, 1994)

1.2.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les systèmes de défense contre le stress oxydatif ont pour rôle d'inhiber l'oxydation d'un substrat. Les antioxydants primaires, qui sont pour la plupart des enzymes, vont limiter la production des (ROS) et les antioxydants secondaires, qui peuvent être des substances lipo- ou hydrosolubles, vont piéger les ROS sous une forme peu réactive (Zielinski et Portner., 2000). Parmi les enzymes antioxydantes on peut citer :

a. *La superoxyde dismutase (SOD)*

La SOD est une enzyme antioxydante primaire importante qui protège l'organisme contre les produits toxiques du métabolisme cellulaire. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ($O_2\bullet$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (figure 05) (Matsumoto et Fridovich., 2001 ; Sturtz et al., 2001).

b. *La glutathion peroxydase (GPX) et réductase (GR)*

- La glutathion peroxydase (GPX) : catalyse la réaction de transformation des peroxydes d'hydrogène H_2O_2 et lipidiques ROOH (figure 05) respectivement en eau et alcool ROH. Cette réaction met en jeu une molécule antioxydante non enzymatique, le glutathion, sous sa forme réduite GSH (Meister et Anderson., 1983). Le glutathion agit comme un capteur direct des radicaux libres, un cosubstrat pour l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase, cofacteur de plusieurs autres enzymes, et forme des conjugués dans des réactions de xénobiotiques (Gregus et al., 1996). Deux molécules de GSH sont nécessaires et formeront la forme oxydée du glutathion à savoir le glutathion disulfide GSSG.
- La glutathion réductase (GR), a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPX maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries. (Powers et Jackson., 2008)

c. *La catalase (CAT)*

La catalase est une enzyme qui se trouve essentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol. Son rôle est l'élimination d' H_2O_2 par une transformation en H_2O et O_2 . Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges (Figure 05). (Powers et Jackson., 2008)

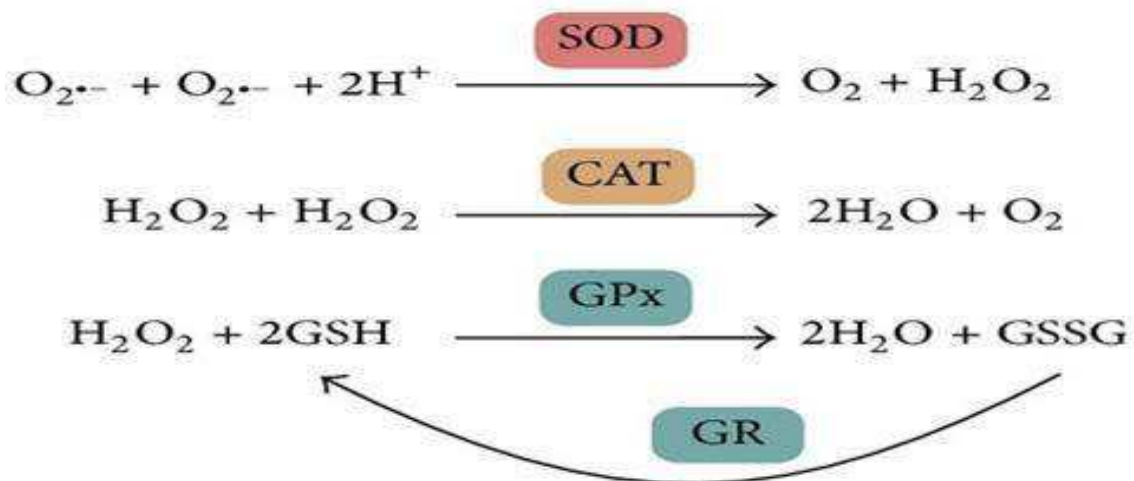


Figure 5 : *Système principal de défense antioxydant enzymatique in vivo et leurs réactions sur les radicaux libres et l'oxyde d'hydrogène. SOD, superoxyde dismutase ; CAT, catalase ; GPx, glutathion peroxydase ; et GR, glutathion réductase. (Cheng Peng et al., 2014)*

1.2.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, les antioxydants non enzymatiques doivent être apportés par l'alimentation car la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme. Cette catégorie d'antioxydant regroupe les oligoéléments, le glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C.

a. Les oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux importants dans la défense contre le stress oxydant. Tous ces composants antioxydants exigent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPX de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action pro oxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss). (Halliwell B et Gutteridge., 1990)

b. Les caroténoïdes

Ils sont majoritairement représentés par le bêta-carotène, appelé aussi « provitamine A ». Du fait de leur faible concentration dans l'organisme, leurs rôles antioxydants sont considérés

comme faibles, mais complémentaires des systèmes principaux évoqués plus haut. Le bêta-carotène désactive l'oxygène l'O₂, et piège les radicaux peroxydes ROO[•] (Krinsky, 1989).

c. Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide permettant la réduction des peroxydes cellulaires grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPX). Le GSH intervient également dans le cycle de régénération de 2 vitamines antioxydantes : la vitamine E et la vitamine C (Powers et Jackson., 2008). Le rapport entre la forme réduite du glutathion GSH et la forme oxydée GSSG permet de caractériser le statut redox de la cellule et constitue aussi un bon marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H₂O₂ est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji et al., 1992)

d. Les ubiquinones et cytochrome c

- Le coenzyme Q10 ou ubiquinol a un rôle de transporter les électrons présents dans la chaîne oxydative mitochondriale, dans les membranes cellulaires, dans le plasma et dans les lipoprotéines. Il fournit une protection pour les membranes contre la lipo-péroxydation à cause de sa capacité de donner des électrons (Powers et Jackson., 2008).
- Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d'O₂^{•-} produit au niveau de la chaîne respiratoire (Skulachev, 1998).

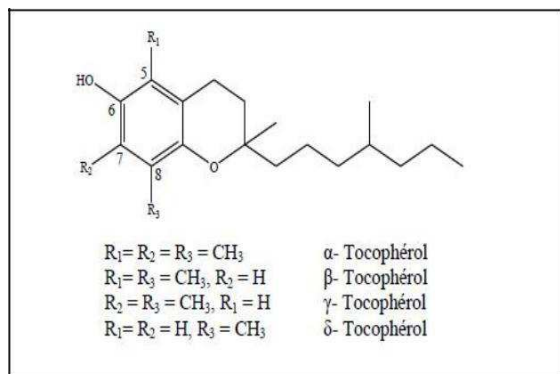
e. Les vitamines E et C

• **Vitamine C (Acide ascorbique)**

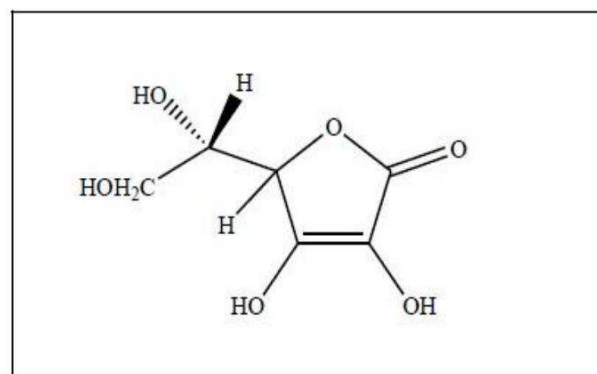
La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène. (Fain, 2004). C'est un antioxydant puissant hydrosoluble, qui a l'effet de piéger / neutraliser à des concentrations très faibles des espèces réactives de l'oxygène (Carr et Frei., 1999 ; Césarini, 2004). Elle est un réducteur susceptible de limiter la peroxydation lipidique et intervient dans la régénération des autres antioxydants tels que les α -tocophérol (Greff, 2011 ; Halliwell et Gutteridge., 1986).

• **La vitamine E (Tocophérols)**

Les tocophérols sont des composés liposolubles, ils regroupent quatre substances dont l'alpha-tocophérol qui est l'antioxydant majeur, la plus active biologiquement (Wang et Quinn., 2006). Il est présent dans les membranes des cellules et les organites cellulaires, où il joue un rôle important dans la suppression de la peroxydation des lipides et il s'accumule sur ces sites au sein des cellules dans lesquelles la production des radicaux d'oxygène est plus grande (Dutta-Roy, 1999).



Structures des tocophérols.



Structure de l'Acide ascorbique.

Figure 6 et 7 : (Chérifa B, 2014)

f. Acide Alpha-lipoïque

L'acide alpha-lipoïque est un cofacteur d'un complexe enzymatique qui participe au cycle de Krebs, le complexe alpha-cétoglutarate déshydrogénase. Il agit de différentes manières comme antioxydant : il piège certaines ROS telles que l'oxygène l' O_2 et le radical hydroxyle (Packer et al., 1995).

1.3. Dégâts cellulaires

Les ROS peuvent être la cause de l'induction de plusieurs dommages tels que: les peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée).

1.3.1. La peroxydation lipidique

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbert, 2005 ; Pamplona et al., 2000). La peroxydation de lipides induit une diminution de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong et al., 2004). Dès lors la perméabilité au calcium augmentée, la fixation aux récepteurs altérée, Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999).

Tout ceci peut conduire à l'apoptose si les dégâts sont importants (McMichael., 2007). Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett., 1999). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4- hydroxynonanal (4- HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique.

1.3.2. L'oxydation des protéines

Les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Levine, 2002). Ces réactions d'oxydation peuvent être classées en deux catégories : celles qui cassent les liaisons peptidiques et celles qui entraînent des modifications des peptides par l'addition des produits issus de la peroxydation lipidique.

Les ROS provoquent aussi une dénaturation des protéines : altération des groupements thiols, formation de ponts disulfures, accentuation du caractère hydrophobe d'où agrégation des protéines qui les rend plus résistantes à la protéolyse physiologique (Grandjean, 2005).

1.3.3. Les dommages de l'ADN

Il existe, au sein de la cellule, deux types d'ADN : l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ROS du fait de son potentiel de séparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources des ROS cellulaires : la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (Richter *et al.*, 1988). Les mécanismes principaux des dommages de l'ADN sont : l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial, sa localisation proche de la membrane interne, l'inhibition des mécanismes de réparations, et une structure circulaire sans introns augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (Ames *et al.*, 1993 ; Cortopassi *et al.*, 1992).

1.4. Stress oxydatif induit par les médicaments

L'oxydation des lipides est un facteur de risque cardiovasculaire au même titre qu'une hypertension artérielle, qu'un HDL bas ou un LDL haut. En dehors des facteurs pro-oxydants classiques, certains médicaments peuvent être responsables d'un stress oxydatif plus ou moins important. Par définition, le stress oxydatif induit par les médicaments est impliqué comme un mécanisme de toxicité dans de nombreux tissus et systèmes d'organes, y compris le foie, les reins, les systèmes cardiovasculaire et nerveux (figure 8) (Damian *et al.*, 2012).

L'utilisation prolongée de diurétiques thiazidique génèrent un stress oxydatif, les preuves concernant la relation entre l'HCTZ et l'endommagement oxydatif de l'ADN sont variables et parfois contradictoires, il s'est avéré que l'utilisation concomitante de HCTZ avec des régimes riches en graisses augmente le stress oxydatif dans le foie (Ribeiro *et al.*, 2013) et dans le cerveau des rats (Ribeiro *et al.*, 2009). La diminution de certains antioxydants enzymatiques et non

enzymatiques a été observé chez les rats nourris avec un régime riche en fructose (HFD) avec ou sans supplémentation en HCTZ (Ribeiro et al., 2013). En outre, une augmentation du stress oxydatif cortical après traitement HCTZ chez l'homme a été observée dans une autre étude (Reungjui et al., 2007).

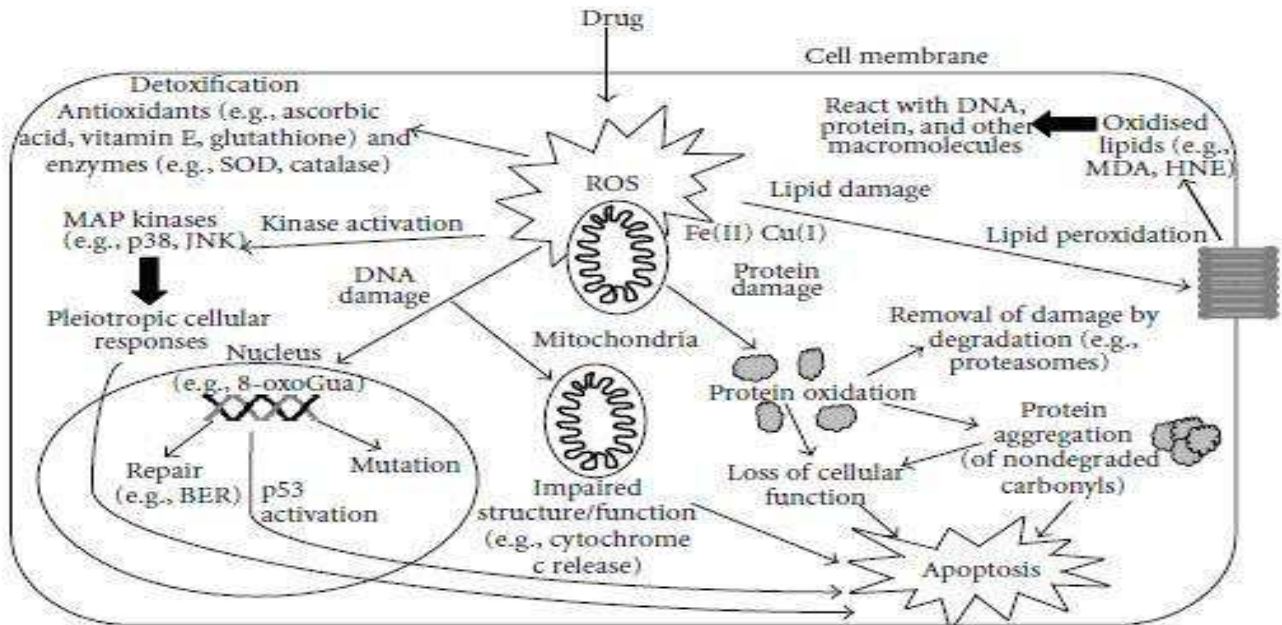


Figure 8 : Les principaux effets du stress oxydatif induit par les médicaments dans les cellules. L'augmentation des ROS intracellulaires peut entraîner des dommages à l'ADN, l'oxydation des lipides et des protéines. Les voies de signalisation MAP kinase sont des médiateurs clés de la réponse cellulaire. (Damian G et al., 2012)



HYDROCHLOROTHIAZIDE

2. Hydrochlorothiazide

Les diurétiques sont des substances médicamenteuses qui augmentent le volume urinaire. Ils favorisent l'élimination des électrolytes et de l'eau par différents mécanismes d'action.

L'utilisation des diurétiques a pour but de traiter des maladies où il y a rétention excessive de sodium et d'eau : insuffisance cardiaque, cirrhose hépatique, œdème.

Les thiazides sont la classe la plus utilisée. Ce sont les diurétiques de première intention lors d'un traitement prolongé. (Joanne Bourgeois *et al.*, 1977)

Il s'agit de sulfamides, la majorité appartenant à la série des benzothiadiazines. Ils ont une bonne action diurétique et une action antihypertensive, il présente peu d'effets toxiques et n'entraînant pas d'accoutumance. (Nicolas V *et al.*, 1979). Hydrochlorothiazide et Chlorothiazide sont les diurétiques les plus couramment utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle. Certains les préfèrent à la chlorthalidone en une seule prise journalière, mais dans ce cas ; une augmentation significative des lipides sanguin a été observée (lancet, 1975).

2.2. Structure et origine :

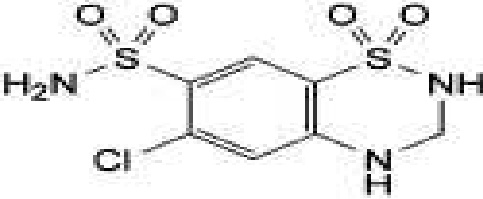
2.2.1. Description de l'Hydrochlorothiazide

C'est un diurétique thiazidique (Reynolds, 1989). Il est utilisé pour réduire les œdèmes associés à l'insuffisance cardiaque congestive ; il est aussi utilisé comme un agent antihypertenseur, et même pour des indications particulières telles que la maladie de Ménière (Roydhouse, 1974) et la réduction de la formation de calculs rénaux chez les patients souffrant d'hypercalciurie (Yendt *et al.*, 1970 ; Baggio *et al.*, 1986). La dose quotidienne d'hydrochlorothiazide dans le traitement de l'œdème est de 25 à 50 mg après une dose initiale de deux fois cette quantité. La dose quotidienne pour les enfants est de 2,5 mg/kg pc et celle pour les nourrissons de moins de six mois, de 3,5 mg/kg pc. Les doses antihypertensives d'hydrochlorothiazide varient entre 25 et 20 mg par jour (Reynolds, 1989).

2.2.2. Les propriétés de l'hydrochlorothiazide

Hydrochlorothiazide est synthétisé soit par la réaction du paraformaldéhyde avec la 5-chloro-2,4-disulfamoylaniline en milieu non aqueux, soit par la réaction du formaldéhyde avec le 6-chloro-7-sulfamoyl-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxyde dans une solution aqueuse alcaline (Deppeler, 1981). Hydrochlorothiazide ou 6-Chloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide 1,1-dioxyde a la forme d'une poudre blanche cristalline, sans odeur particulière. La formule brute est $C_7H_8ClN_3O_4S_2$, sa masse molaire est de 297,7 g.mol⁻¹. Il est pratiquement insoluble dans l'eau, le chloroforme et l'éther, et peu soluble dans l'alcool mais soluble dans l'éthanol, l'acétone, le diméthylformamide, le méthanol, le n-butylamine, ou encore la soude. (Voir le tableau 1)

Tableau 2 : les propriétés d'hydrochlorothiazide

Structure/formule moléculaire/poids moléculaire	Structure	
	Formule moléculaire	$C_7H_8ClN_3O_4S_2$ (O'Neil, 2001)
	Poids moléculaire	297.7 g.mol^{-1} (O'Neil, 2001)
Propriétés physico-chimiques	Solubilité	- Très légèrement soluble dans l'eau (722 mg / L à 25 ° C (Deppeler, 1981) - soluble dans l'éthanol à ~ 750 g / L ; dans l'acétone (WHO, 2006) - soluble dans l'ammoniaque diluée ; facilement soluble dans une solution d'hydroxyde de sodium, dans la n-butylamine et dans le diméthylformamide ; peu soluble dans l'alcool ; insoluble dans l'éther, le chloroforme et dans les acides minéraux dilués (HSDB, 2013).
	Goût	Goût légèrement amer (Mc evoy 2002)
	Point de fusion	273 - 275 C° (O'Neil, 2001)
	Forme/odeur/couleur	Une poudre blanche cristalline sans odeur (WHO, 2006)
	Densité	1.693 g/cm^3 (Lookchem, 2013)
Propriétés pharmacologiques (Nicolas V et al., 1979)	Spécialité	Esidrex®
	Voie d'administration	Orale
	Présentation	Comprimé à 25 mg
	Posologie	50 – 100 mg/24 hr
	Délai d'action	2 heures
	Effet maximum	4 heures
	Durée d'action	12 Heures au plus

Les valeurs Toxique de l'HCTZ (national toxicology program,2003)	DL50	Rat	Par voie intrapéritonéal (ip) est 234 mg/kg
		Rat	Par voie Sous-cutané (sc) est 1270 mg/kg
		Souris	Par voie Orale est 3080 mg/kg
		Souris	Par voie Intrapéritonéal est 578 mg/kg
		Souris	Par voie Sous-cutané est 1470 mg/kg
		Souris	Par voie Intraveineuse est 590 mg/kg

2.3. Pharmacocinétique et pharmacodynamique

2.3.1. Pharmacocinétique

L'absorption de HCTZ par le système digestive est rapide mais pas totalement, principalement au niveau du duodénum et du jéjunum supérieur, et dans une moindre mesure au niveau l'estomac. Sa biodisponibilité varie selon les sujets de 60 % à 80 % (Beermann et *al.*, 1976), Elle peut être diminuée chez les patients qui présentent une insuffisance cardiaque ou des œdèmes importants (John et *al.*, 1989), le pic plasmatique est obtenu en moyenne 2-3 h heures après son administration par voie orale (Patel et *al.*, 1984). Concernant sa distribution, la liaison d'HCTZ aux protéines plasmatiques est de 60%, et son volume de distribution de 0,8l/kg. L'hydrochlorothiazide circulant est liée aux protéines sériques (40 % à 70 %), essentiellement à l'albumine sérique. Il s'accumule également dans les érythrocytes à une concentration représentant environ 1,8 fois la concentration plasmatique (Beermann et *al.*, 1976). La demi-vie d'élimination plasmatique est variable d'un sujet à un autre puisqu'elle se situe entre 6 heures jusqu'à 15 heures. (Barbeiya et *al.*, 1982 ; Patel et *al.*, 1984), Il est majoritairement excrété sous forme inchangée (non métabolisée) dans les urines. 95% d'une dose d'HCTZ administrée par voie IV est retrouvée inchangée dans les urines contre 65% par voie orale. La clairance rénale moyenne était d'environ 300 ml / minute. (Beermann et *al.*, 1976 ; Barbhaiya et *al.*, 1982). L'HCTZ traverse la barrière placentaire, il est détectable dans le lait maternel (Moffatt et *al.*, 2004), mais pas dans le sang du nourrisson (Miller et *al.*, 1982).

2.3.2. Pharmacodynamique :

La cible connue de HCTZ est le transport $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ dans le tubule distal du néphron, où ils réduisent la réabsorption du sodium des tubules rénaux, entraînant une excrétion accrue d'eau et d'électrolytes, tels que le sodium, potassium, chlorure et magnésium. Les thiazides réduisent la résistance périphérique artérielle en activant les canaux potassiques activés par le calcium et en inhibant plusieurs anhydrases carboniques dans le tissu vasculaire, provoquant ainsi une vasodilatation (Pickkers et *al.*, 1999). Il provoque une natriurèse abondante, accompagnée d'une augmentation de la concentration du chlore dans les urines et de la kaliurie. L'élévation du PH urinaire est secondaire et discutée.

Des études ont montré d'autres effets rénaux reconnus de l'hydrochlorothiazide comprennent une augmentation de la libération de rénine (Griffing et *al.*, 1983) et une augmentation de la libération de kallikréine (Overlack et *al.*, 1982).

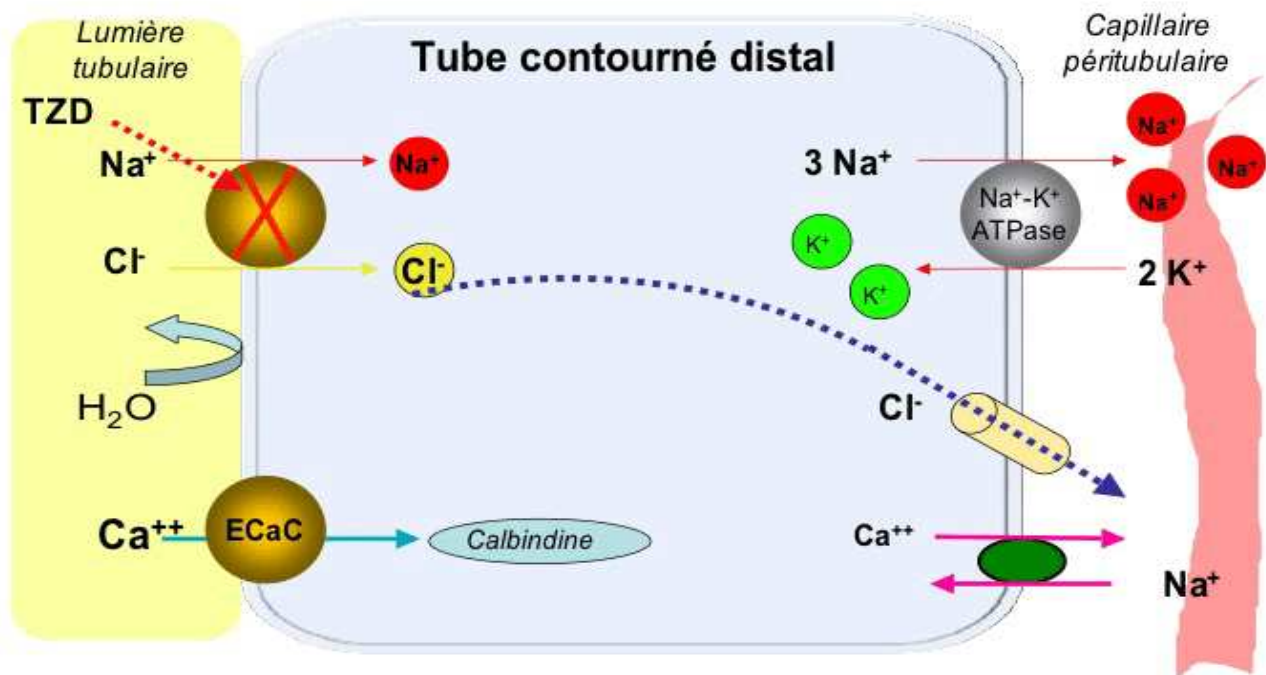


Figure 9 : mécanisme d'action d'hydrochlorothiazide. (Rousseau., 2014)

2.4. Toxicité et effet secondaire

2.4.1. Immunotoxicité

Elles peuvent être responsable de réactions allergiques cutanées (éruptions papuleuses, accidents de photosensibilisation, voire toxidermie) (livre) les réactions immunologiques qui ont été rapportée pendant le traitement par HCTZ sont :

Une pneumopathie allergique sévère (Beaudry et Laplante., 1973), Un certain nombre de maladies cutanées de nature allergique ont été rapportées aussi chez des patients traités par des diurétiques thiazidiques et une dermatite photo allergique ressemblant au lupus érythémateux cutané subaigu (Ebstein et Wintroub., 1985 ; Reedet al., 1985 ; Hardwiek et Saxe., 1986). Des Néphrites interstitielles (Linton et al., 1980 ; Scully et al., 1983), et une pancréatite (Cornish et al. 1961) ont été rapportées aussi chez des patients traités par des diurétiques thiazidiques y compris hydrochlorothiazide.

2.4.2. Hématotoxicité :

Des troubles hématologiques (thrombopénie, agranulocytose ou leucopénie), thrombocytopénie (Eisner et Crowell., 1971), hémolyse intravasculaire (Beck et *al.*, 1984), anémie hémolytique immunitaire avec hémolyse intravasculaire aiguë (Vila et *al.*, 1976).

2.4.3. Hépatotoxicité

Hyperglycémie

Le foie est un organe qui joue un rôle très important dans la modulation de l'homéostasie de glucose, plusieurs études ont démontré que les altérations hépatiques qui résultent par les ROS peuvent altérer l'homéostasie cellulaire et aggraver les syndrome métabolique (Hsieh et *al.*, 2011 ; Kohen et *al.*, 2002). Des études ont démontré que le traitement à long terme par des diurétiques thiazidiques peut diminuer la sensibilité à l'insuline(insulino-résistance), accélérant ainsi le développement du diabète sucré. (Bonner, 1994)

2.4.3.1. Bilan lipidique

Les triglycérides sont composés d'une molécule de glycérol liée à trois acides gras et digérés par la lipase pancréatique. Les triglycérides sont un composant majeur des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et servent de source d'énergie. Ils sont décomposés dans l'intestin, absorbés par les cellules intestinales, et combinés avec le cholestérol et les protéines pour former des chylomicrons qui sont transportés dans la lymphe vers la circulation sanguine. (Suckow et al., 2012)

Les triglycérides sont généralement transportés du foie par des particules de lipoprotéines de très basse densité (VLDL), assemblées selon un processus complexe et constituées de triglycérides, de cholestérol, de phosphatidylcholine et d'apolipoprotéines. L'inhibition de ce processus à l'un de

plusieurs niveaux peut entraîner l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes et par conséquent le développement de la stéatose hépatique (Ronald *et al.*, 2013).

Hydrochlorothiazide connue par l'augmentation de taux de cholestérol comme il peut augmenter le taux des triglycérides. (Reungjui *et al.*, 2007)

2.4.4. Déséquilibre électrolytique :

Des études ont montré que l'administration de fortes doses d'hydrochlorothiazide entraîne souvent un déséquilibre électrolytique, y compris une alcalose hypochlorique, une hyponatrémie, une hypokaliémie et une hypercalcémie (Porter *et al.*, 1978 ; Zalin *et al.*, 1984 ; Bayer *et al.*, 1986 ; Reynolds., 1989), une hypomagnésémie. (Dyckner *et al.*, 1979)

L'hypokaliémie a été associée à diverses complications cliniques telles que faiblesse musculaire, crampes, léthargie et arythmies cardiaques graves selon Hollifield,1986 et Solomon,1987. Cette déplétion du potassium induit par les thiazides est susceptible de jouer un rôle dans l'altération du métabolisme du glucose, par l'altération des cellules Bêta de Langerhans qui libèrent l'insuline selon l'explication de (Rowe *et al.*, 1980), dans le thème de l'effet de la carence en potassium expérimentale sur le métabolisme du glucose et de l'insuline.

Dans l'autre côté, **l'hypomagnésémie** aggrave l'hypertension, les arythmies cardiaques, la faiblesse musculaire, l'ischémie cardiaque et même provoquer une hypocalcémie (Whang *et al.*, 1977 ; Weiner *et al.*, 1997), le magnésium intracellulaire joue un rôle clé dans le développement de diabète à cause de son effet modulateur sur l'absorption du glucose par l'insuline, en fait, un point de vue indique qu'il y a une association entre l'hypomagnésémie avec les troubles métabolique (diabète, hypertension (Barbagallo *et al.*, 2003) et l'augmentation des radicaux libre (Ribeiro *et al.*, 2013).

2.4.5. Déséquilibre dans quelques paramètres biochimiques

2.4.5.1. Hyperparathyroïdie

La prise de HCTZ peut être une cause de plusieurs effet indésirable, il s'agit d'une hyperparathyroïdie, des suggestions disent que les thiazidiques provoquent une hyperparathyroïdie, et que l'excrétion réduite de calcium et l'augmentation de la perte de potassium observées avec ces diurétiques peuvent être la cause de l'augmentation de la sécrétion d'hormone parathyroïdienne (Paloyan *et al.*, 1969 ; Christensson *et al.*, 1977 ; Klimiuk *et al.*, 1981).

2.4.5.2. Neurotoxicité

$\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$, une enzyme contenant du sulfhydryle, elle est intégrée dans la membrane cellulaire et responsable du transport actif des ions sodium et potassium dans le système nerveux. Ce processus régule les concentrations cellulaires Na^+ / K^+ et donc leurs gradients à travers la membrane plasmique, qui sont nécessaires pour les fonctions vitales comme les cotransports membranaires, la régulation du volume cellulaire et l'excitabilité membranaire (Doucet., 1988 ; Jorgensen., 1986).

L'HCTZ peut aussi entraîner une neurotoxicité par l'inactivation de la Na^+ / K^+ -ATPase dans le cerveau des animaux traités avec de fortes doses (Ribeiro et al., 2009), cette enzyme entraîne une dépolarisation membranaire partielle qui permet une entrée excessive de Ca^+ dans les neurones et provoque la neurotoxicité (Beal et al., 1993), L'inhibition induite par HCTZ peut être associée à une augmentation du stress oxydatif qui peut accélérer la dénaturation de Na^+ / K^+ -ATPase (Yufu et al., 1993). En fait, les groupes -SH de cette enzyme sont très sensibles au stress oxydatif et aux agents oxydants. (Carfagna et al., 1996)

2.5. Effets toxiques sur la reproduction et la toxicité prénatale

Dans le cadre du ``Collaborative Périnatal Project``, dans lequel ils ont étudié l'ingestion de médicaments et l'issue de la grossesse sur une série de 50 282 femmes en 1959-1965, 107 femmes ont été exposées à l'hydrochlorothiazide pendant le premier trimestre de la grossesse. Il y avait neuf enfants malformés dans le groupe exposé. (Heinonen et al. 1977).



CYCLOPHOSPHAMIDE

1. Généralités sur le cyclophosphamide

Le cyclophosphamide (ou **Endoxan®**) (Figure 10) constitue l'exemple type des dérivés de moutardes azotées.

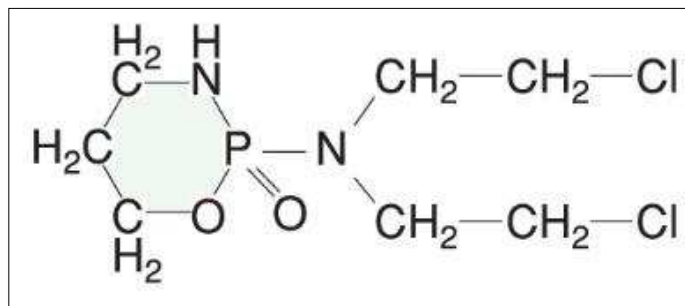


Figure (10): Structure de cyclophosphamide ou (N, N-bis (2-chloroéthyl) -1,3,2-oxazaphosphinan-2-amine 2-oxyde)

Le cyclophosphamide est un agent alkylant bifonctionnel appartenant au groupe des oxaphosphorines, c'est une molécule ancienne possédant de nombreuses indications et souvent utilisée en association en oncologie. C'est un antinéoplasique utilisé contre plusieurs types de cancer tel que : le carcinome du sein, du poumon, des ovaires, des testicules et de la vessie, les sarcomes des tissus mous et des os, le lymphome Hodgkinien et non-Hodgkinien, la leucémie lymphoïde chronique, le neuroblastome et la tumeur de Wilms et de myélomes multiples (Moore, 1991 ; Gilbert *et al.*, 1998 ; Chhipa *et al* 2006).

L'effet cytotoxique de cyclophosphamide dépend de leur capacité d'alkylation de l'ADN. L'activation de CP dans le foie par la cytochrome oxydase P450 conduit à la formation de la moutarde azotée, le métabolite actif de CP. Cette dernière pénètre dans le noyau (via une diffusion passive et/ou via un transporteur), où elle se transforme en ion aziridine à pH alcalin ou neutre, puis réagit avec les bases puriques de l'ADN, notamment au niveau de l'azote N-7 de la guanine, en liant leur groupe actif (le chloroéthyl) à l'azote, ceci aboutit à la formation des ponts inter ou intra caténaire provoquant une toxicité tissulaire, voir la mort des cellules (Figure 11). D'autres bases d'ADN pourraient être les cibles d'action de la moutarde azotée comme l'azote N-1 et N-3 de l'adénine, l'azote N-3 de la cytosine, et l'oxygène O-6 de la guanine mais elles sont moins importantes.

Après la formation des ponts avec l'ADN, les cellules tumorales seront soumises à l'apoptose initiée par des lésions et l'inhibition de la réplication de l'ADN, la modulation du cycle cellulaire, et d'autres effets antiprolifératifs. L'apoptose est catalysée par une activation intracellulaire d'une cascade de caspases (Zhang *et al.*, 2005).

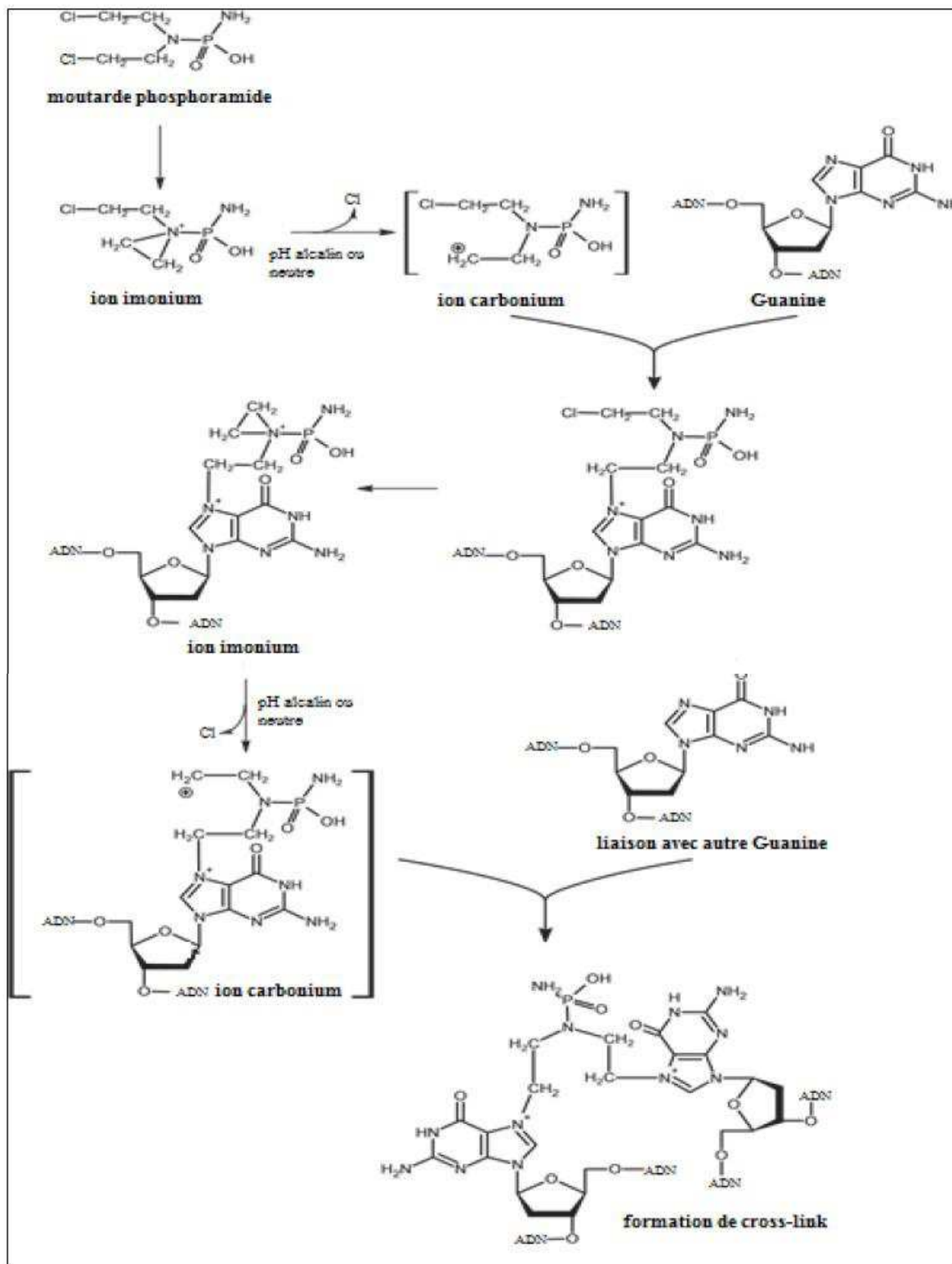


Figure (11): Le mécanisme d'action du cyclophosphamide au sein des cellules (Zhang *et al.*, 2005).

2. Pharmacocinétique du cyclophosphamide

La connaissance de la pharmacocinétique de cyclophosphamide à travers des études précliniques et cliniques est très utile afin d'améliorer son indice thérapeutique.

2.1. Administration et distribution du cyclophosphamide

Le cyclophosphamide est soluble dans l'eau ou l'alcool et peut être aisément administré par voie orale ou intraveineuse (i.v). La biodisponibilité orale de CP est de 85 à 100% (Aeshlimann *et al.*, 1998), avec une petite fraction du médicament qui est métabolisé en raison de l'effet du premier passage dans le foie et l'intestin. Le temps (T_{max}) nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale (C_{max}) est environ 1 à 2 heures, après l'administration orale de CP (Goren, 1996). Après administration par voie orale ou intraveineuse, le CP est rapidement distribué dans tout le corps par liaison aux protéines plasmatiques à un taux de 20%, alors que la capacité de liaison aux protéines est plus élevée pour son métabolite (<67%) (Moore, 1991).

Après l'administration i.v, le volume de distribution (V_d) se rapproche du volume d'eau corporelle totale, ce qui suggère que la distribution de l'agent a lieu avec une liaison tissulaire minimale. Le CP et son métabolite actif sont fortement liés aux érythrocytes qui peuvent servir de transporteurs du métabolite actif du CP. Le métabolite pro-toxique, le 4-hydroxy-PC, est piégé par voie intracellulaire et transporté vers les tissus tumoraux (Zhang *et al.*, 2005).

2.2.Métabolisme du cyclophosphamide

Le CP est principalement métabolisé au niveau du foie à environ 70 à 80% (De jonge *et al.*, 2005) pouvant aller jusqu'à 90% de la dose administrée est activé par les enzymes hépatiques, notamment les cytochromes CYP3A4, CYP2C9 et la CYP2B6 qui jouent un rôle prédominant. Au moins deux voies de biotransformation sont impliquées, la voie principale consiste en un hydroxylation du cyclophosphamide en 4-hydroxycyclophosphamide, qui pénètre par diffusion passive dans le sang et est transporté vers des cellules tumorales par les globules rouges, un métabolite actif pouvant être oxydé en 4-cétocyclophosphamide ou 4-oxocyclophosphamide, un métabolite inactif, ou être en équilibre avec sa forme active acyclique (tautomère), l'aldophosphamide. Deux voies métaboliques sont alors possibles pour l'aldophosphamide, soit la production de la moutarde phosphoramidate, alkylant considéré généralement comme le principal responsable de l'effet anticancéreux (avec une β -élimination d'une molécule d'acroléine qui ne participe pas à l'effet thérapeutique, mais est la principale responsable des cystites hémorragiques), soit l'inactivation par formation, sous l'action de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), de carboxyphosphamide, non considérée comme toxique mais qui peut être

transformée en une moutarde azotée .Il existe une voie métabolique mineure conduisant à la formation d'un métabolite inactif, le 2-déchloroéthylcyclophosphamide et d'un métabolite actif ,le chloroacétaldéhyde (Figure 12) (Boddy *et al.*, 2000; De jonge *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2005).

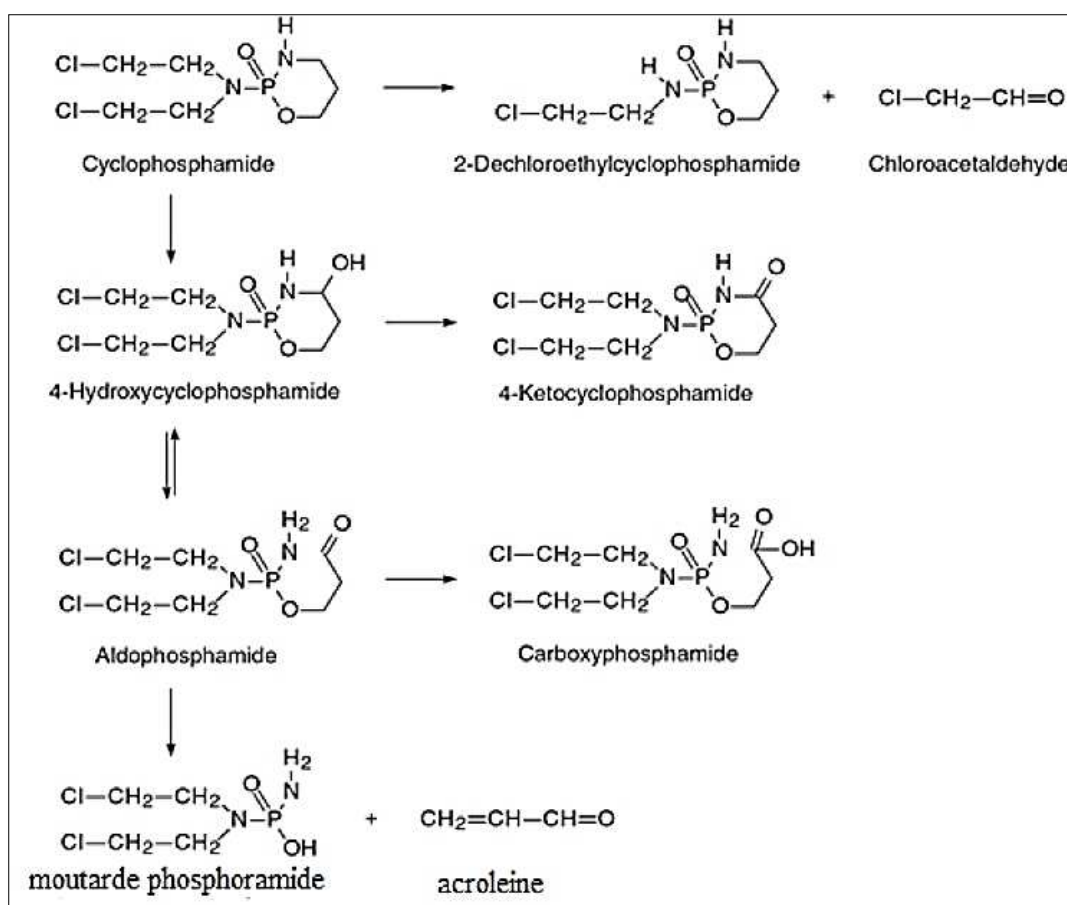


Figure (12): Schéma du métabolisme de cyclophosphamide (De Jonge *et al.*, 2005).

2.3.Élimination du cyclophosphamide

Le cyclophosphamide est principalement excrété par voie urinaire sous forme de métabolites. Seule une faible proportion de cyclophosphamide est éliminée dans les urines sous forme inchangée (5 à 20% de la dose administrée) et sa demi-vie d'élimination est soumise à de larges variations individuelles, elle est en moyenne de 5 heures avec une clairance corporelle totale (CL) d'environ 2,5-4,0 L / h / m² (Boddy *et al.*, 2000 ; Kerbusch *et al.*, 2001). L'élimination de la moutarde phosphoramide et de l'acroléine peut se réaliser par conjugaison spontanée ou par médiation de l'enzyme glutathion-S-transférase (GST) (De jonge *et al.*, 2005).

3. La dose thérapeutique et effets secondaires du cyclophosphamide

Lorsqu'il est utilisé seul en chimiothérapie du cancer, la dose est de 40-50mg/kg par voie intraveineuse ou 1-5 mg/kg par jour par voie orale. Par contre, lorsqu'il est utilisé en combinaison avec d'autres agents la posologie est inférieure (Moore *et al.*, 1991). D'autres parts dans le traitement du syndrome néphrotique chez les enfants, la dose administrée de CP est à 2,5-3mg/kg par jour pendant 60-90 jours. Lorsque le CP est administré à des doses élevées, il peut causer la pancytopénie et la cystite hémorragique.



PARTIE
EXPÉRIMENTALE

1. Matériel

1.1. Produits chimiques

La formulation commerciale de l'hydrochlorothiazide (6-Chloro-3,4-dihydro-2H-1, 2, 4 benzothiadiazine-7-sulfonamide 1,1-dioxyde) et le cyclophosphamide ((RS)- N, N-bis(2-chloroéthyl) -2-oxo-1-oxa-3-aza-2λ⁵-phosphacyclohexan-2-amine) ont été obtenu du laboratoire de Toxicologie Moléculaire (université de Jijel). Le HCTZ a été préparé dans l'éthanol et l'eau distillée à la dose de 0,2 g/kg. Le CP a été préparé dans l'eau physiologique à préparation injectable avec la dose de 0,08 g/kg.

1.2. Matériel biologique

1.2.1. Entretien des animaux

Notre étude a été réalisée sur 12 rattes femelles et 4 males de souche Wistar albinos, fourni par le CRD de groupe Saidal Alger, de poids corporel compris entre (190-200g) Les animaux sont élevés dans des cages standards, marqués et répartis en 4 lots, avec libre accès à la nourriture et à l'eau. Ces cages ont été nettoyées chaque jour avec renouvellement de la litière. L'animalerie est éclairée à 12/24h et maintenue à une température entre 20 et 27 °C.

1.2.2. L'accouplement des animaux :

Nous avons réparti les rates en deux lots 5 rattes pour chaque lot puis accouplées conformément aux recommandations de laroche et rossel (1990) à raison de cinq rattes pour 2 male placés dans chaque lot pendant 2 jours pour augmenter la chance de la fécondation.

Le succès de l'accouplement a été évaluer par l'identification des spermatozoïdes dans les frottis vaginaux (ils sont présents dans le mucus vaginal pendant au moins 12 heures après la copulation) réalisés les deux jours de l'accouplement et observées au microscope.

Identification des spermatozoïdes sur frottis vaginaux

La technique de frottis vaginal consiste à prélever à l'aide d'un coton-tige mouillé dans l'eau distillée de liquide visqueux retrouvé au niveau du vagin de la ratte. Une fois prélevé, le frottis est étalé sur une lame pour procéder à la coloration selon la méthode d'Issac et Wurch (1966) qui consiste à appliquer quelques gouttes du Bleu de Méthylène sur la lame (solution alcoolique de 1%) puis rincer à l'eau distillée. L'observation se fait sous microscope. Le jour d'observation des spermatozoïdes correspond au jour 0 de gestation.

1.1.1. Diagnostic de la gestation

Il n'est pas toujours facile d'être sûr que la ratte est gestante même après observation des spermatozoïdes, car elle ne grossit que la dernière semaine, et cette prise de poids n'est significative que si la portée est nombreuse. Il existe cependant une série de méthodes et de signes (Davis et Yeary.,1979) :

- La prise du poids : une franche prise de poids vers le 16/17ème jour.
- Les mamelles deviennent très apparentes : ceci n'est pas valable que si on a le coup d'œil et que si la ratte n'a pas déjà allaité une portée.
- Absence de chaleurs : continuer à mettre la ratte en présence du mâle si rien de ne passe au bout d'une semaine, c'est une preuve de réussite.
- Le ventre est énorme pendant presque 3 semaines : on doit pouvoir sentir des petites boules en la palpation.

Nous nous sommes surtout basées sur la prise de poids et l'augmentation du volume du ventre pour le diagnostic de la gestation.

1.2.3. Traitement des animaux

Après l'accouplement, nous avons séparé les mâles, et les rattes ont été réparti en deux lots de cinq rattes chacun lui-même divisé en deux groupes de deux rattes pour le premier et de trois rattes pour le second :

- Le 1^{er} lot recevant 1ml de cyclophosphamide par voie intrapéritonéale à raison de 80 mg/kg pendant 8 jours (témoin positif), de J₀ à J₇ pour le premier groupe, et de J₈ à J₁₅ pour le second groupe
- Le 2^{ème} lot recevant 1ml d'Hydrochlorothiazide par voie orale à raison de 200 mg/kg pendant 8 jours, de J₀ à J₇ pour le premier groupe, et de J₈ à J₁₅ pour le second groupe

Afin d'assurer l'implantation de l'embryon, nous avons retardé l'administration de l'HCTZ et le cyclophosphamide aux seconds groupes tout en respectant la même posologie et les mêmes voies d'administration.

La pesée a été effectuée 2 jours par semaine tout au long de la période de l'expérimentation, le poids corporel final est calculé avant le traitement et après la dernière dose de traitement.

Une mesure de poids a été effectué 2 fois par semaine pendant la période de l'expérimentation, le poids corporel final est calculé avant le traitement et après la dernière dose de traitement.

1.2.4. Prélèvement du sang

Le sang est prélevé à l'aide d'un tube capillaire d'hématocrite à travers le sinus rétro-orbital au niveau de l'œil, et recueillie dans des tubes EDTA pour le dosage des paramètres hématologiques et dans des tubes héparines pour le dosage des paramètres biochimiques et ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 15min (SIGMA 3-16PK), le plasma est aliquoté et conservé à une température -20°C jusqu'au moment de dosage et l'analyse.



Figure 13 : Photographie originale prise de prélèvement sanguin à travers le sinus rétro-orbital au niveau de l'œil.

1.2.5. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes

A la fin de délai d'administration 16^{ème} jour de gestation avant la mise bas et après anesthésie légère par chloroforme (pour immobiliser un peut l'animal et en même temps garder la circulation sanguines), la paroi abdominale est ouverte , le foie , les reins de toutes les ratte traité par l'hydrochlorothiazide et le cyclophosphamide sont prélevés, plongé et lavé dans l'eau physiologique (0,9%) pour éliminer le sang puis pesé, puis divisé en cinq fractions, les fractions sont utilisés pour le dosage des paramètres du stress oxydatif sont maintenues à (-20°C), alors que la fraction destinée à l'étude histologique est conservé dans une solution de formol tamponné 10% .

2. Méthodes

2.1. Dosage des paramètres biochimiques

2.1.1. Exploration de la fonction hépatique

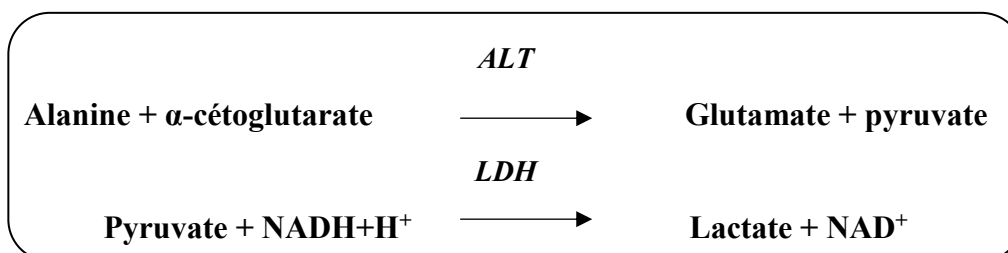
Les paramètres biochimiques mesurés pour évaluer l'atteinte hépatique sont : les transaminases (TGP), et le bilan lipidique (triglycéride).

2.1.1.1. Dosage des paramètres biochimique enzymatique

➤ Mesure de l'activité des transaminases glutamate-pyruvate (TGP)

Le dosage de transaminase glutamate-pyruvate est réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit SPINREACT (Espagne).

La transaminase glutamate-pyruvate (TGP) appelée aussi l'alanine aminotransférase (**ALAT**) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate-déshydrogénase (**LDH**) et le NADH selon les réactions suivantes :



Le taux de la diminution de la concentration en NADH+H⁺, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de l'alanine aminotransférase (**Murray,1984**)

Pour ce dosage nous avons mélangé et incubé 1ml de réactif de travail avec 100ul de l'échantillon pendant une minute, puis lu l'absorbances de l'échantillon pendant 3 minutes à une minute d'intervalle à 340 nm.

Calcul de l'activité de TGP

L'activité catalytique de la TGP est calculée par la formule suivante :

$$\text{L'activité de TGP (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

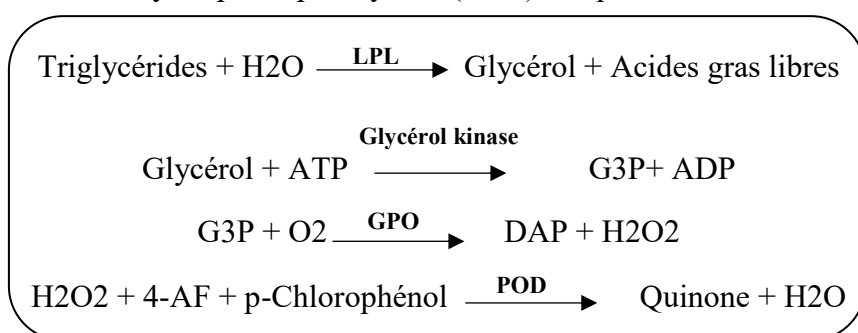
Où : A est l'absorbance.

2.1.1.2. Dosage des paramètres biochimique non enzymatique

➤ Dosage de triglycérides

Les triglycérides incubés avec de la lipoprotéinlipase (LPL) libèrent du glycérol et des acides gras libres. Le glycérol est phosphorylé par du glycérophosphate déshydrogénase (GPO) et de l'ATP en présence de glycérol kinase (GK) pour produire du glycérol-3-phosphate (G3P) et de l'adénosine-5-di phosphate (ADP). Le G3P est alors transformé en dihydroxiacétone phosphate (DAP) et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par le GPO.

Au final, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagit avec du 4-aminophénazone (4- AF) et du p-chlorophénol, réaction catalysée par la peroxydase (POD), ce qui donne une couleur rouge :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de triglycérides présents dans l'échantillon testé.

Pour ce dosage nous avons mélangé et incubé 1ml de réactif de travail avec 10 µl de l'échantillon pendant exactement 5 minutes, puis lire les absorbances de l'échantillon à 505 nm en comparaison avec le blanc de réactif. L'activité de triglycéride est calculée par la formule suivante :

$$\text{Taux de TRG (mg/dL)} = \frac{(A)\text{échantillon} - (A)\text{blanc}}{(A)\text{étalon} - (A)\text{blanc}} \times 200 \text{ (étalon Conc)}$$

Où : facteur de conversion : mg/dl x 0.0113 = mmol/L

2.1.2. Exploration de la fonction rénale :

2.1.2.1. Dosage de la créatinine plasmatique et urinaire

La créatinine provient du métabolisme de la créatine musculaire et la quantité quotidienne produite est relativement constante. La mesure de la créatinine dans le sang et les urines est le test à utiliser pour une évaluation de base de la fonction rénale. La créatinine sérique et urinaire est mesurée selon la méthode colorimétrique-cinétique de Jaffe. (Bonsnes *et al.* 1945)

La mesure est faite à l'aide d'un kit SPINREACT au spectrophotomètre à 492 nm. La créatininémie et la créatininurie sont exprimée en mg/dl.

La clairance de la créatinine est le coefficient d'épuration plasmatique ou nombre de ml de plasma complètement épurés de créatinine par le rein, rapporté au temps. Elle permet d'estimer la filtration glomérulaire (DFG) et plus globalement la fonction rénale.

La Clairance rénale peut donc être calculée suivant la formule :

$$\text{Clairance de la créatinine (ml/min)} = \frac{U \times V}{P \times 1440} \text{ (ml/min)}$$

Sachant que :

U = concentration urinaire de créatinine (en $\mu\text{mol/L}$)

V = débit urinaire (en ml par 24h soit 1440 min)

P = concentration plasmatique de créatinine (en $\mu\text{mol/L}$)

2.2. Exploration du stress oxydant :

2.2.1. Préparation de la fraction cytosolique :

Nous avons réalisé la méthode de Iqbal *et al* (2003) pour préparer la fraction cytosolique. Pour cela 1 g de foie et de rein adulte sont coupés et homogénéisés par un Potter en verre dans 3 volumes de la solution tampon phosphate (KH_2PO_4 0.1M PH 7.4) contenant le KCL (1.17%) après l'homogénéisation, nous avons centrifugé l'homogénat à 2000 rpm pendant 15 minute à 4°C. Une autre centrifugation a été réalisé pour séparer les débris cellulaires sur le surnageant par une centrifugeuse (SIGMA 3 – 16 PK) à 9600 rpm pendant 30 min à 4 C°. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé pour réaliser les dosages des paramètres du stress oxydant cytosolique.

2.2.2. Dosage tissulaire des Protéines totales :

Le dosage des est effectuée selon la méthode de Bradford (1976). Pour cela, 4 ml de bleu de Coomassie est ajouté à 100 μl de la fraction cytosolique dilué à 1/10^{ème}. Le mélange est incubé à une température ambiante pendant 15 min. la lecture d'absorbance est effectué à une longueur d'onde de 595 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée entre 0.062 et 1 mg/ml en utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard (BSA). (Annexem figure 03)

2.2.3. Dosage du MDA cytosolique :

La peroxydation lipidique de foie et reins est évaluée par la quantification du MDA qui est un produit métabolique résultant par des réactions de peroxydation lipidique qui attaquent les lipides membranaires polyinsaturés par la génération des ROS. Dans notre étude, nous avons utilisé la méthode de Ohkawa et al., 1979 pour évaluer la concentration du MDA au niveau de la fraction cytosolique. Le dosage repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100°C) entre le MDA et l'acide Thiobarbituriques (TBA) d'un complexe coloré rose susceptible d'un dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde $\lambda=530$ nm

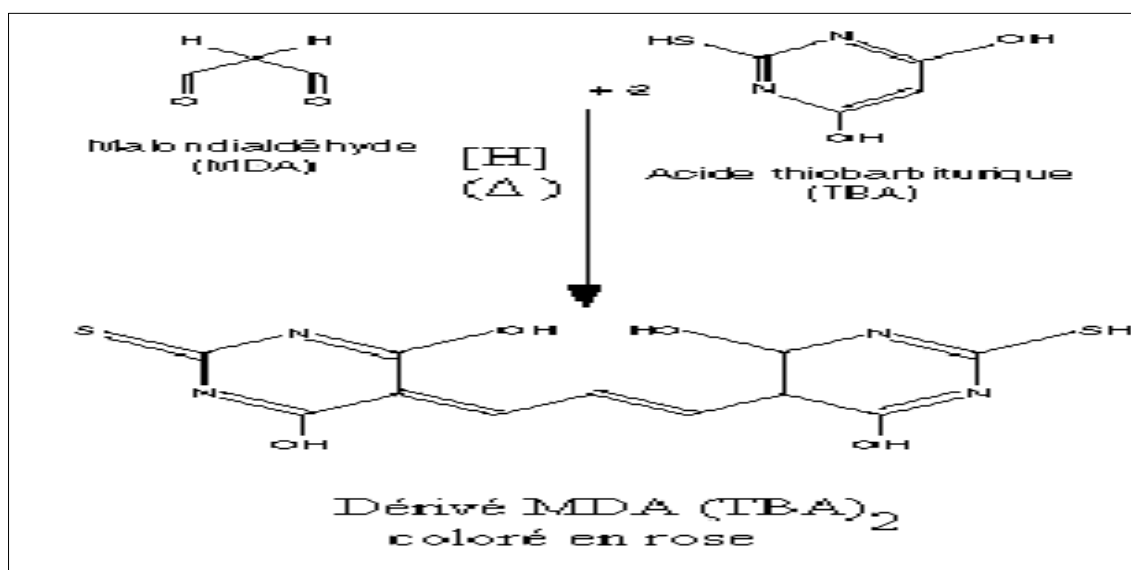


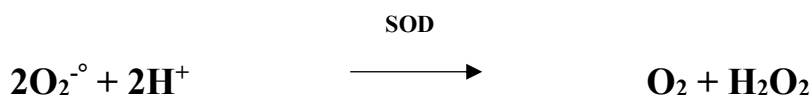
Figure 14 : Principe de Dosage Malondialdéhyde (Laguerre *et al.*, 2007).

Pour réaliser ce dosage, un mélange réactionnel constitue de : 0.5 ml de la fraction cytosolique de foie et rein a été ajouté à 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20 % et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0.67 %. Après incubation au bain marie à 100 °C pendant 15 minutes puis refroidissement au cours d'eau de robinet, 2-4 ml de n-butanol ont été additionné ; le mélange est ensuite centrifuge pendant 15 minutes à 3000 tours/min.

Le taux du MDA est déduit à partir d'une gamme étalon préparée les mêmes conditions en utilisant une solution du tétraoxypropane (TEP) qui donne après leur hydrolyse du MDA (Annexe, figure 01)

2.2.4. Mesure de la SOD

La SOD est un enzyme antioxydant très importante dans le maintien d'une basse concentration de l'anion superoxyde. Elle catalyse la dismutation de l'O²⁻ en peroxyde d'hydrogène et en oxygène selon la réaction suivante :



L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase cytosolique a été déterminée selon la méthode de Marklund et Marklund (1974). La mesure de l'activité de cet enzyme est basée sur la capacité du SOD à inhiber l'auto-oxydation du pyrogallol.

Pour la mesure de l'activité de la SOD, dans la cuve de mesure mettre : 850µL du tampon tris HCL (50mM, PH=8.2), 20 µL de la fraction cytosolique, 100µL de l'EDTA (10mM) et ensuite 50µL de pyrogallol (2.5 mM dans HCL 10mM). La lecture de la DO est effectuée à 420 nm chaque minute pendant 5 minutes.

L'activité enzymatique du superoxyde dismutase est exprimée en UI/mg de protéines selon la relation suivante :

$$\text{Inhibition total (\%)} = \frac{\text{DO}_{\text{Blanc}} - \text{DO}_{\text{Echantillon}}}{\text{DO}_{\text{Blanc}}} \times 100$$

$$\text{U de SOD/mg de protéines} = \frac{\text{Inhibition totale}}{n \times 50}$$

Où : n est la quantité de protéines (en mg) présente dans le volume de l'échantillon utilisé.

2.2.5. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

Pour réaliser l'estimation de l'activité de la catalase nous avons suivi la méthode de clairborne (1985). Le principe de cette mesure repose sur la disparition de H₂O₂ en présence de la catalase de la source enzymatique (la fraction cytosolique) à 25°C selon La réaction suivante :



5 µl de la source enzymatique (fraction cytosolique) a été prélevé puis 1 ml de tampon phosphate (0.1M, pH 7.2) et 950 µl de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (0.019M) ont été additionné. La décomposition de l'H₂O₂ en présence de la source enzymatique est mesurée par le spectrophotomètre à 240 nm chaque minute pendant 2 minute. L'activité de la catalase et calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité CAT (UI/mg de protéine)} = 2.3033/T \times \log (A1/A2) / [\text{protéines}].$$

Sachant que :

T : Intervalle de temp en minute.

A1 : Absorbance au temp 0 min.

A2 : Absorbance au temp 1 min.

2.2.6. Dosage du glutathion Cytosolique :

Pour évaluer le taux de glutathion réduit chez les rats, nous avons utilisé la méthode de Sedlak et Raymond, (1967) utilisant le réactif d'Ellman. Il s'agit d'une réaction chimique évaluant en une seule étape suivie d'une détection colorimétrique. Le réactif d'Ellman (Acide 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) ou DTNB est réduit le groupe thiol (SH) pour donner une mole d'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque par mole de SH. L'acide mercaptobenzoïque est un anion ayant une intense coloration jaune et par conséquent peut être utilisée pour évaluer les groupes thiols (SH) (Figure 15).

50µl de la source enzymatique de chaque organe sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0.1 M, PH = 8). Après nous avons ajoutés 20µl de réactif d'Ellman (DTNB 0.01 M) à 3 ml du mélange de dilution. L'incubation a été effectuée à une température ambiante pendant 15 min. la lecture des résultats est réalisée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

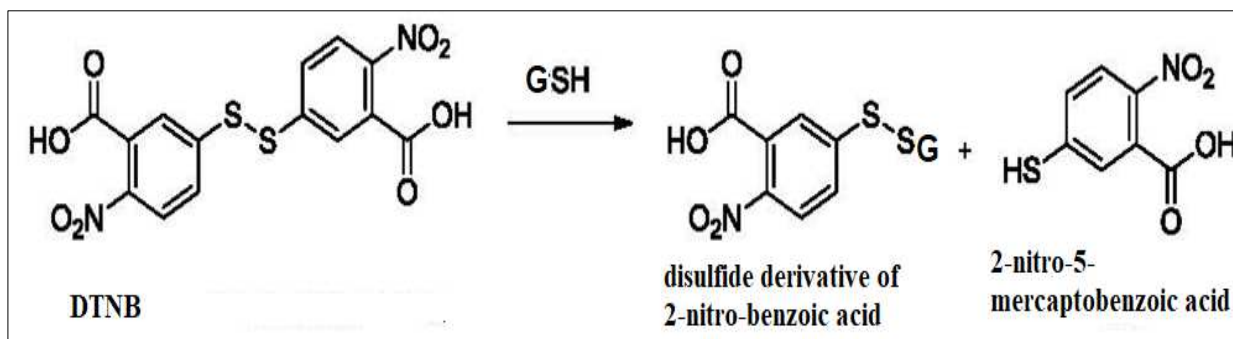


Figure 15 : principe du dosage de la GSH (Sedlak et Raymond,1967)

Le taux de GSH déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparé dans les mêmes conditions que le dosage, et les concentrations sont exprimés en millimoles de glutathion par gamme de foie ou de rein (Annexe, Figure 02)

2.3. Etude histologique

Les foies et les reins prélevés sont directement plongés dans le formol tamponné (10%). Avant l'inclusion dans la paraffine, les foies et les reins doivent être déshydratés et cela par l'immersion dans un bain d'alcool (70%). Les blocs de paraffine sont ensuite taillés, puis découpés en section de 5 μm et colorés à l'hématoxyline / éosine. Les coupes histologiques sont observées au microscope optique ($\times 400$) équipé d'un appareil photographique. (Houlot, 1984)

3. Evaluation statistique

Les résultats numériques et graphique ont été représentés sous forme de moyenne \pm écarte-type. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes du groupe traité par HCTZ et de groupe traité par le CP à celle du groupe témoin en utilisant le « t » test de Student.

Comparaison entre les groupes traités par avec le témoin :

- $P > 0.05$: la différence n'est pas significative (ns)
- $P < 0.05$: la différence est significative (*)
- $P < 0.01$: la différence est hautement significative (**)
- $P < 0.001$: la différence est très hautement significative (***)
- Avec P : Seuil de signification

Le calcul statistique est réalisé en utilisant le logiciel EXCEL 2016



RÉSULTATS

ET

DISCUSSION

1. Évolution pondérale des animaux

L'effet de l'administration de l'hydrochlorothiazide (200 mg/kg) par voie orale et l'administration de cyclophosphamide (80 mg/kg) par injection intrapéritonéale sur le gain de poids des rattes femelle Albinos Wistar par rapport aux témoins négatifs est représenté dans la figure 13.

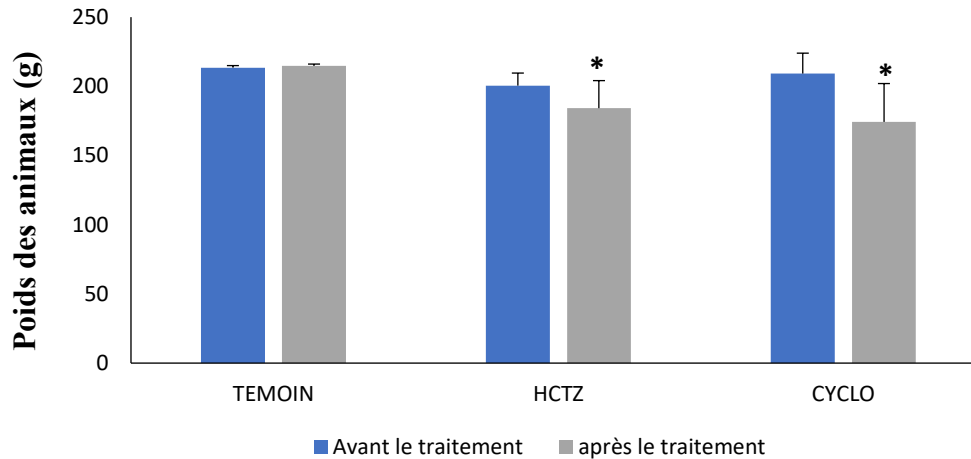


Figure 13 : La représentation graphique du poids des rattes Wistar albinos avant et après le traitement par l'HCTZ (200mg/kg) et le cyclophosphamide (80 mg/kg).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$) en comparaison avec le témoin.

Dans la présente étude, nous avons observé une diminution statistiquement significative ($p < 0.05$) du gain de poids des rattes traitées avec l'HCTZ (184.2 \pm 19.94 g) par rapport aux rattes témoins négatifs (214 \pm 1.35 g) et une diminution significative ($p < 0.05$) du poids des animaux traités par le CP (174.3 \pm 27.7 g) par rapport au groupe témoin (214 \pm 1.35 g).

La baisse du poids chez les rattes traitées par l'HCTZ (200 mg/kg) et le CP (80 mg/kg) pendant 15 jours reflète une diminution de la masse corporelle des rattes de ces deux groupes, nous avons relevé une baisse moyenne de 16.32 g pour le lot traité par l'HCTZ et 34.9 g pour les rattes recevant le CP. Ces résultats sont similaires à ceux avancés par (Ribeiro et al., 2013) qui ont obtenu un effet négatif sur le gain de poids corporel suite à l'administration d'une forte dose de HCTZ, et cela même en utilisant un régime riche en graisse et qui est censé entraîner une augmentation de poids.

1.1. Variations du poids absolu et relatif du foie et du rein

L'effet de l'administration de l'hydrochlorothiazide (200 mg/kg) et de cyclophosphamide (80 mg/kg) sur le poids absolu et relatif du foie et des reins par rapport aux rattes témoins négatifs est représenté dans le tableau 3.

Tableau 3 : variations du poids absolu et relatif du foie et reins.

	Témoin	HCTZ	CP
Poids absolu du foie (g)	9.09±0.1	6.98±0.67**	7.38±1.07*
Poids relatif du foie (%)	4.23±0.02	3.80±0.33	4.18±0.19
Poids absolu du rein (g)	0.45±0.19	0.60±0.01(ns)	0.64±0.03(ns)
Poids relatif du rein (%)	0.18±0.09	0.33±0.03	0.37±0.07

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. () indique une différence comparée au témoin négatif. Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$) ; (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$).*

La pesée du foie des rattes nous a permis de noter, que le traitement par l'HCTZ a provoqué une diminution statistiquement très significative ($p < 0.01$) du poids absolu du foie (6.98±0.67 g) en comparaison avec le groupe témoin négatif (9.09±0.1 g) et une diminution significative ($p > 0.05$) du poids absolu du foie du groupe traité par le CP (7.38±1.07 g) par rapport au groupe du témoin négatif (9.09±0.1 g). Nous avons enregistré également une diminution du poids relatif du foie mais de façon non significative ($p > 0.05$) à la fois chez les rattes traitées par l'HCTZ (3.80±0.33%) et chez celles traitées par le CP (4.18±0.19%) par rapport au lot témoin (4.23±0.02 %).

Le poids absolu et relatif des reins est augmenté de façon non significative ($p > 0.05$) respectivement pour le groupe HCTZ (0.60±0.01) et (0.33±0.03 %) et pour le groupe traité par le CP (0.64±0.03) (0.37±0.07%) par rapport au groupe témoin (0.45±0.19) (0.18±0.09%).

La baisse pondérale du foie (atrophie hépatique), peut être expliqué par une atteinte du tissu hépatique par des processus inflammatoire ou même dégénératifs des hépatocytes, et qui seraient liés à la toxicité de l'hydrochlorothiazide.

L'augmentation du poids des reins constatée pourrait être en corrélation avec les modifications de l'architecture rénale. Cette hydronéphrose est également observée par (Bamouni *et al.*, 2001), et serait due à des lésions glomérulaires associées à des lésions tubulaires principalement dans la région médullaire externe (Reungjui *et al.*, 2007), cette augmentation est mentionnée également par (Bonner *et al.*, 1994).

2. Observations macroscopiques

Les observations macroscopiques des rattes traitées par l'HCTZ et les rattes du groupe CP sont indiquées dans la figure 14 :

Avant le sacrifice nous avons observé une exophtalmie, Chromodacryorrhée et un œdème facial dans le groupe CP (A) en comparant par le visage des rattes traitées par l'HCTZ (B).

Après les sacrifices nous avons observé des anomalies au niveau de quelques organes comme l'observation d'une splénomégalie avec une structure plate de la rate (C) chez les rates traitées par le CP, une hypertrophie des glandes surrénales chez les rates traitées par le HCTZ (D), Concernant les résultats de gestation la fécondation n'a pas été effectuée mais nous avons observé une irritation de l'appareille génitale des rattets gestantes (F).

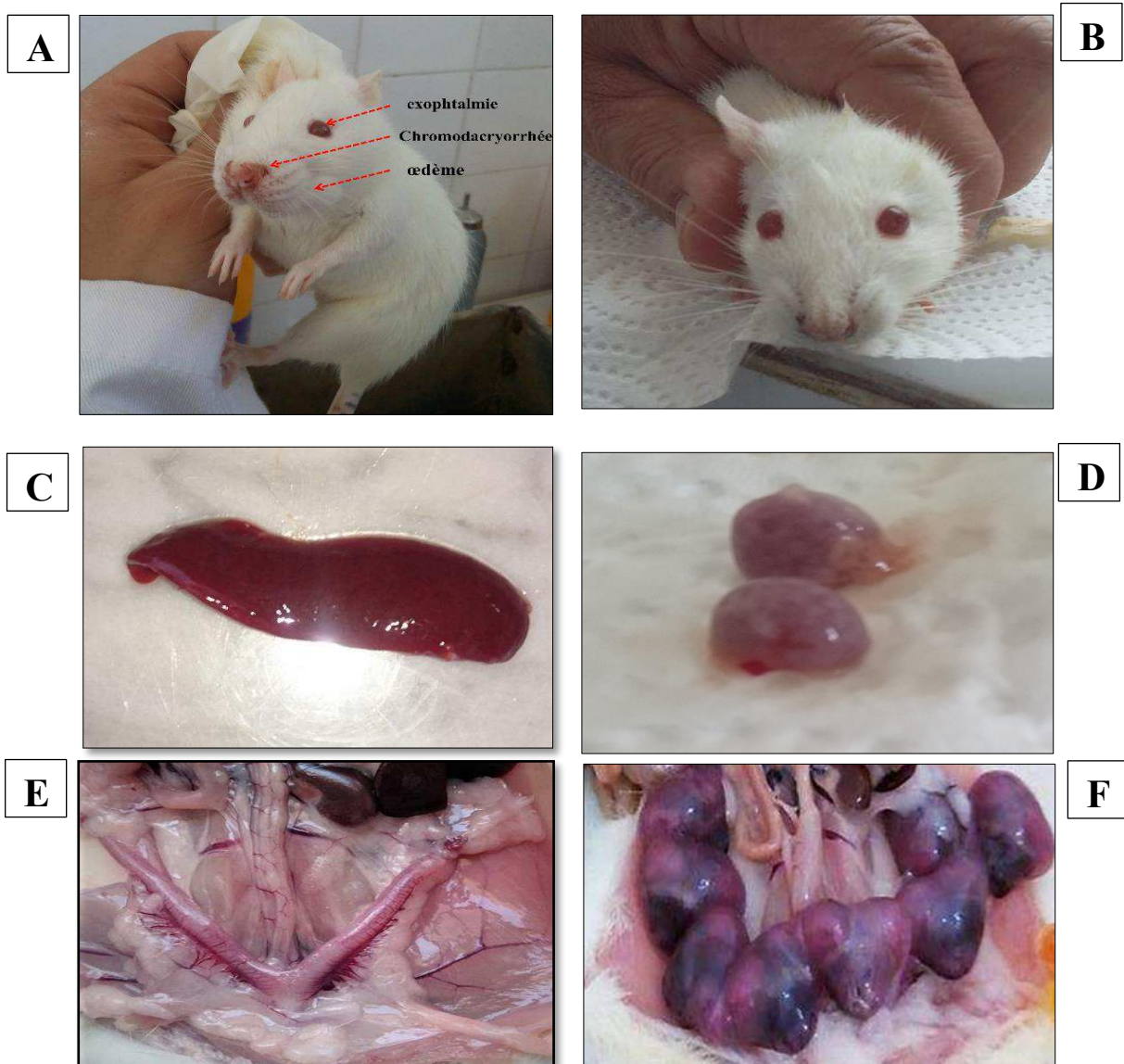


Figure 14 : observations macroscopiques des anomalies au niveau des yeux et visage (A), de la rate (C), des glandes surrénales (D) et de l'utérus (E) chez les rattes traitées par HCTZ (200 mg/kg) et par le CP (80 mg/kg) respectivement.

3. Influence de l'HCTZ sur la fonction rénale et hépatique

3.1. Evaluation de l'activité enzymatique de superoxyde dismutase rénale et hépatique

Le taux de la SOD rénale et hépatique chez les rates traitées par l'hydrochlorothiazide (200 mg/kg), le cyclophosphamide (80 mg/kg) en comparaison au groupe témoin, sont illustrés dans les figures ci-dessous (Figure 15 ; figure 16) respectivement.

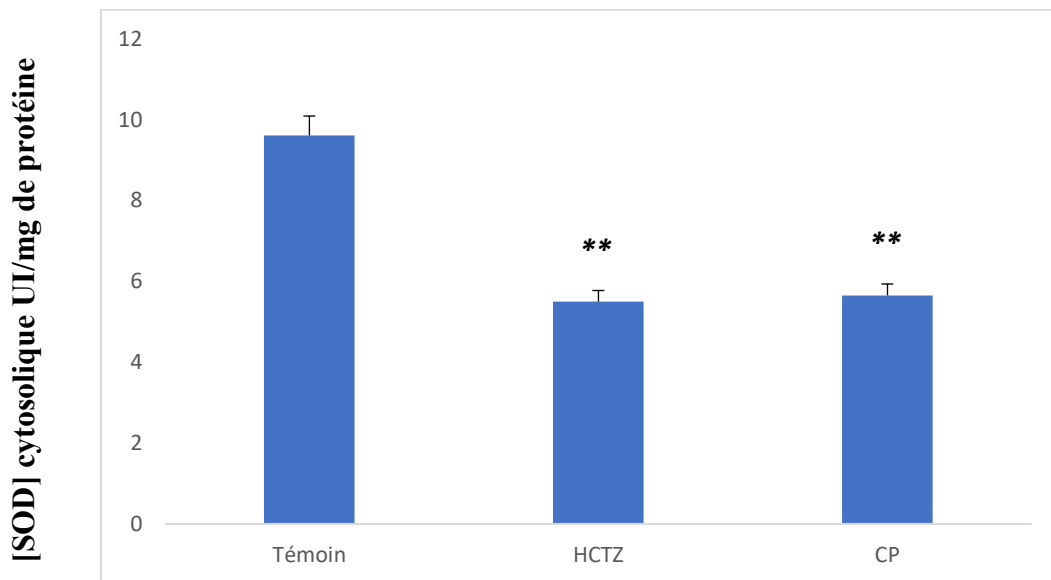


Figure 15 : La représentation graphique de l'activité enzymatique de la SOD rénale des rattes traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. (*) indique une différence comparée au témoin négatif. Teste de Student ; (**) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.01$)

Dans la présente étude, nous avons signalé une diminution hautement significative ($p < 0.01$) de l'activité enzymatique de la SOD rénale chez les rattes traitées par HCTZ en comparaison à celles du lot témoin négatif avec les valeurs (5.5 ± 1.9 UI/mg de protéine contre 9.6 ± 0.05 UI/mg de protéine). Nous avons constaté également une diminution très significative ($p < 0.01$) de la SOD chez les rattes traitées par le CP par rapport au groupe témoin avec les valeurs (5.65 ± 0.19 UI/mg de protéine contre 9.6 ± 0.05 UI/mg de protéine).

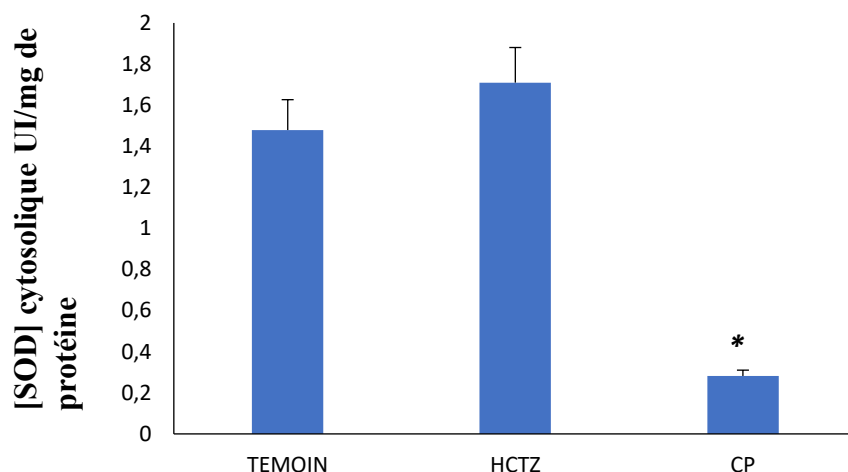


Figure 16 : La représentation graphique de l'activité enzymatique de la SOD hépatique des rattes traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. (*) indique une différence comparée au témoin négatif. Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$)

L'activité enzymatique de la SOD hépatique dans notre étude présente une augmentation non-significative ($P > 0.05$) chez les rates traitées par l'HCTZ en comparaison à celle mesurée chez les rates témoins avec les valeurs (1.70 ± 0.60 UI/mg de protéine contre 1.47 ± 0.18 UI/mg de protéine) respectivement. Nous avons enregistré une diminution significative ($p < 0.05$) de l'activité de la SOD du groupe de CP (0.28 ± 0.35 UI/mg de protéine) par rapport au groupe témoin (1.47 ± 0.18 UI/mg de protéine).

L'activité enzymatique antioxydante de la superoxyde dismutase cytosolique est un paramètre très important pour l'évaluation du stress oxydant. Le radical superoxyde O_2^- , est parmi les premiers espèce toxique formé à partir de l'oxygène, l'élimination ou le maintien de sa concentration à un niveau assez bas est effectué par la SOD qui catalyse sa disparition par dismutation. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ainsi formé est dismuté en oxygène et en eau par la catalase (Andreyev *et al.* 2005)

L'explication probable de la réduction de l'activité enzymatique de la SOD rénal in vivo s'explique par une production intensive de l'anion superoxyde suite au traitement par hydrochlorothiazide et le cyclophosphamide et qui dépasse largement les capacités disponibles de la SOD à éliminer l'anion superoxyde induit par les métabolites toxiques (bansale *et al.* 2001).

Nos résultats confirment également ceux obtenues par plusieurs études montrant que le CP diminue l'activité de la SOD rénale (Sibel *et al.* 2017) et ils sont également en corrélation avec les études montrant que l'HCTZ réduit l'activité antioxydante de la SOD rénale lors d'un stress (Ribeiro *et al.* 2013).

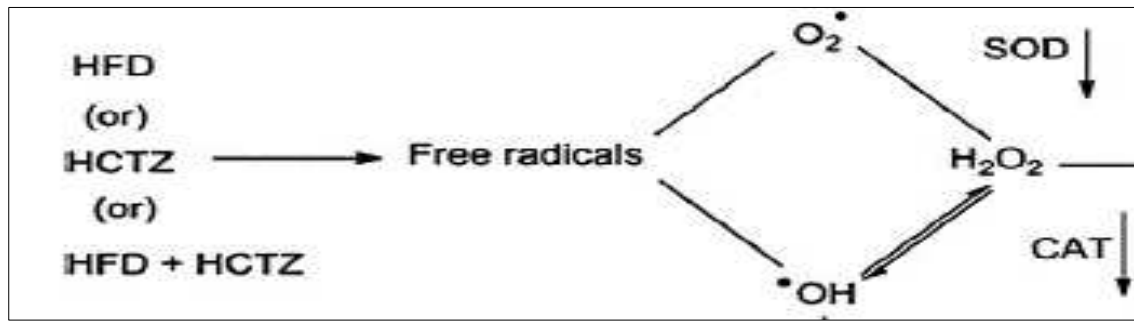


Figure 17 : schéma proposé de l'observation de la diminution d'antioxydants provoqué par l'hydrochlorothiazide (Ribeiro *et al.* 2013).

3.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique rénale et hépatique

La catalase est une enzyme antioxydante et l'un des éléments qui permet le maintien de l'état normal dans la cellule, elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation de peroxyde d'hydrogène en H₂O et en O₂ moléculaire (Marfak, 2003). Elle catalyse la conversion de H₂O₂ en O₂ et H₂O (Cheng *et al.* 2014). Elle est fortement exprimée dans le foie (Liu *et al.* 2009).

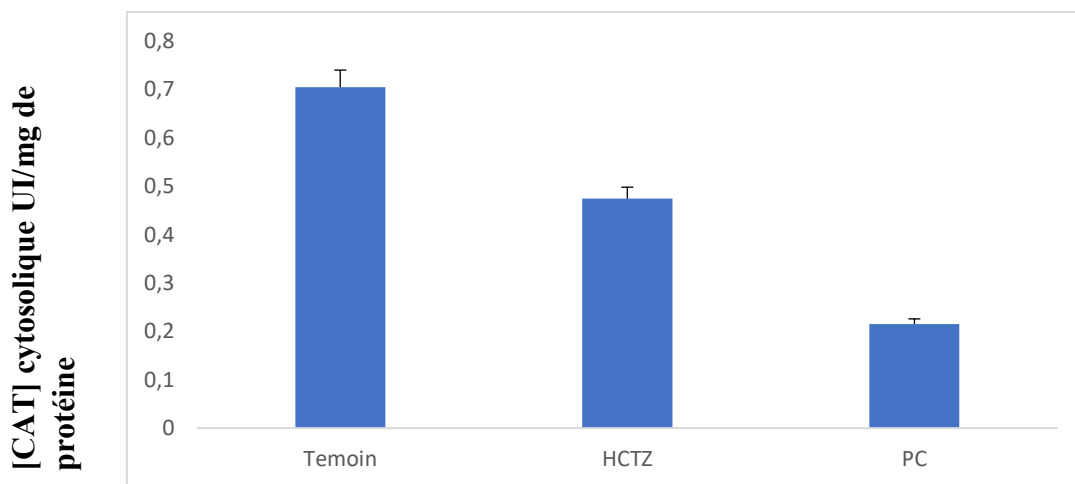


Figure 18 : La représentation graphique de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique rénale des rattes traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rattes témoins

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. (*) indique une différence comparée au témoin négatif. Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$)

L'effet de l'administration prolongée de l'hydrochlorothiazide sur l'activité enzymatique de la catalase rénale et hépatique est illustré dans les figures 19 et 20 respectivement.

Les résultats de notre travail montrent que le traitement par l'HCTZ est sans retentissement sur l'activité enzymatique de la catalase rénale (1.20 ± 0.65 UI/mg de protéine) par rapport aux rattes témoins négatifs (1.31 ± 0.42 UI/mg de protéine), cependant une diminution non significative ($p > 0.05$) chez les animaux traités par le CP a été notée (0.78 ± 0.44 UI/mg de protéine) par rapport aux animaux du groupe témoin (1.31 ± 0.42 UI/mg de protéine).

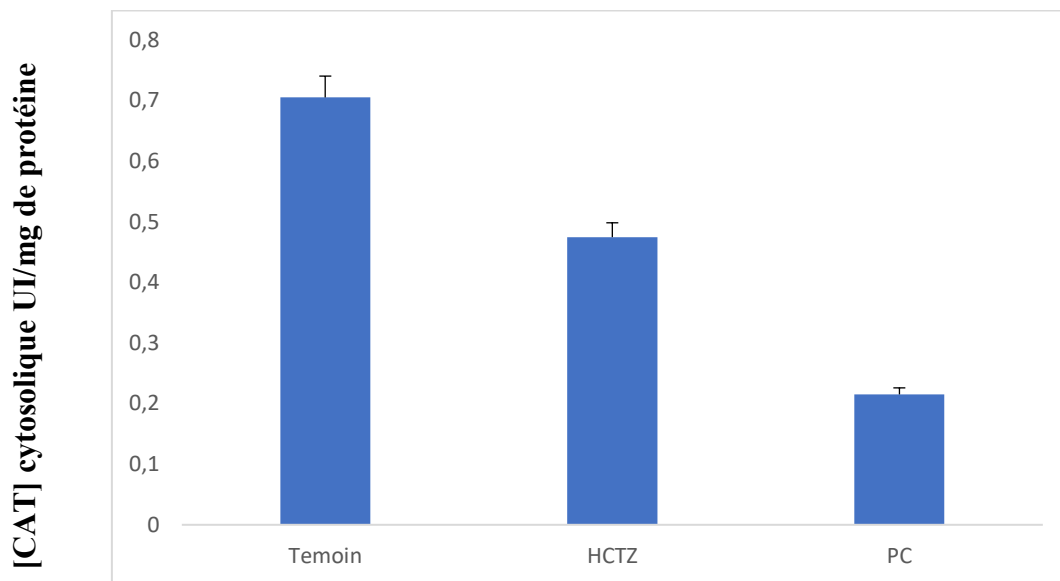


Figure 19 : La représentation graphique de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique des rattes traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rattes témoins

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. (*) indique une différence comparée au témoin négatif. Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$) ; (*) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.01$)

En revanche, nous avons remarqué une diminution statistiquement significative ($p < 0.01$) de l'activité enzymatique de catalase hépatique cytosolique dans le groupe des rattes traitées par l'HCTZ (0.47 ± 0.08 UI/mg de protéine) par rapport aux rattes témoins négatifs (0.70 ± 0.14 UI/mg de protéine), et une diminution significative ($P < 0.05$) chez les animaux traités par le CP (0.21 ± 0.05 UI/mg de protéine) par rapport au groupe témoin (0.70 ± 0.14 UI/mg de protéine).

La diminution de l'activité de la catalase chez les rates traitées par une dose prolongée de l'HCTZ (200 mg/kg) peut être expliquée par une production accrue de peroxyde d'hydrogène qui peut dépasser la capacité antioxydante de la CAT et la production intense de H_2O_2 , pouvant ainsi inhiber son activité (Atli et al. 2006). D'autres chercheurs ont apporté des résultats compatibles avec ceux obtenus dans cette présente étude où l'exposition chronique au HCTZ des rates Wistar Albinos a diminué le taux

l'activité de la catalase hépatique par contre à la catalase rénale qui n'a pas été modifiée (Ribeiro et *al.* 2013).

Le même profil de variation est constaté aussi bien avec l'hydrochlorothiazide qu'avec le cyclophosphamide mais l'augmentation de CAT chez les rates traitées par le CP est plus basse que chez les rates traitées par HCTZ au niveau hépatique et rénal. Cette augmentation de CP est similaire avec d'autres travaux

3.3. Evaluation de la peroxydation lipidique rénale et hépatique

Les variations du taux de MDA cytosolique dans les reins et le foie chez les rates traitées par l'hydrochlorothiazide (200mg/kg) et le cyclophosphamide (80mg/kg) en comparaison par les rates témoins sont illustrées dans les figures 20 et 21 respectivement.

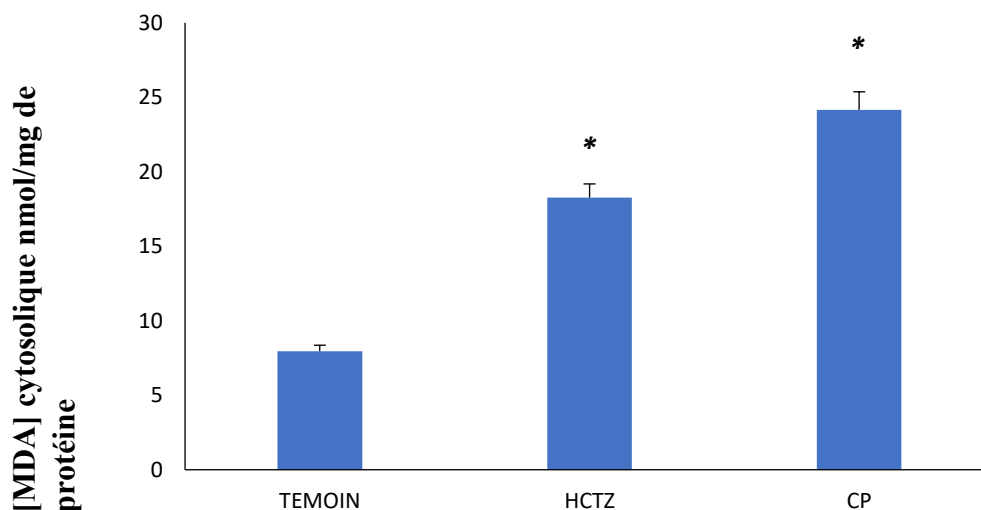


Figure 20 : La représentation graphique du taux de MDA cytosolique rénale des rates traitées par 200 mg/kg de l'Hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de Cyclophosphamide par rapport aux rates témoins

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. (*) indique une différence comparée au témoin négatif. Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$) ; (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$).

On constate une augmentation du taux de MDA cytosolique rénale d'une façon non significative ($p > 0.05$) dans le groupe traité par l'HCTZ (17.09 ± 2.27 nmol/mg de protéine) en comparaison avec le groupe témoin (7.96 ± 1.95 nmol/mg de protéine), et une augmentation significative du taux de MDA ($p < 0.05$) dans le groupe traité par le CP (24.15 ± 3.02 nmol/mg de protéine) en comparaison avec le groupe témoin (7.96 ± 1.95 nmol/mg de protéine).

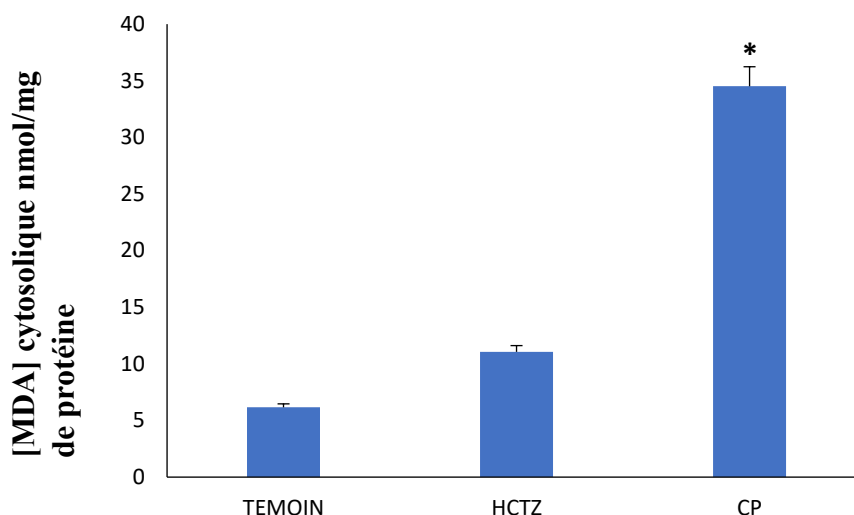


Figure 21 : La représentation graphique du taux de MDA cytosolique hépatique des rates traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rates témoins

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. (*) indique une différence comparée au témoin négatif. Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$) ; (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$).

D'autre part, on remarque une augmentation du taux de MDA cytosolique issu de la peroxydation lipidique dans le foie d'une façon non significative ($p > 0.05$) dans le groupe traité par l'HCTZ (11.06 ± 4.56 nmol/mg de protéine) en comparaison avec le groupe témoin (6.16 ± 3.33 nmol/mg), et une augmentation significative du taux de MDA ($p < 0.05$) dans le groupe traité par le CP (34.51 ± 5.96 nmol/mg de protéine) en comparaison avec le groupe témoin (6.16 ± 3.33 nmol/mg de protéine).

Les résultats de notre étude ont montré une augmentation de la production de MDA, enregistré chez le groupe traité par HCTZ. La teneur élevée du cytosol en MDA est un indicateur d'une peroxydation lipidique initiée par la présence ROS qui attaque les doubles liaisons des acides gras composant les membranes lipidiques. Ces résultats sont similaires à celle de (Ribeiro et al., 2013) en deux travaux différents qui ont démontré l'existence d'une corrélation entre l'utilisation prolongée de HCTZ et la production de MDA. Le même profil de variation est constaté aussi bien avec l'hydrochlorothiazide qu'avec le cyclophosphamide mais l'augmentation de MDA chez les rates traité par le CP est plus élevé que chez les rates traité par HCTZ au niveau hépatique et rénal. Cette augmentation de CP est similaire avec d'autre travaux.

3.4. Evaluation du taux du glutathion (GSH) rénale et hépatique

Les variations du taux de GSH cytosolique dans les reins et le foie chez les rattes traitées par l'hydrochlorothiazide (200mg/kg) et le cyclophosphamide (80mg/kg) en comparaison avec les rattes témoins négatifs sont illustrées dans les figures 22 et 23 respectivement.

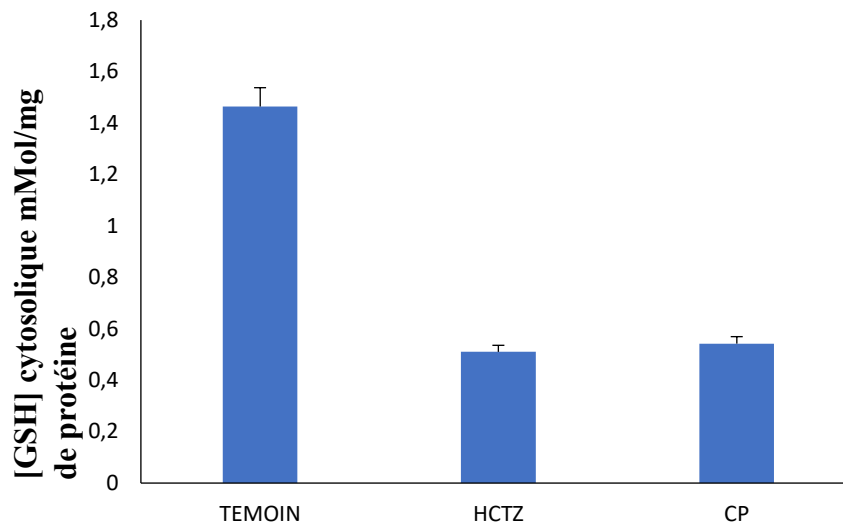


Figure 22 : La représentation graphique du taux de GSH cytosolique rénal des rates traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rattes témoins

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. () indique une différence comparée au témoin négatif. Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$).*

On a constaté une diminution non significative ($P > 0.05$) du taux de la GSH rénale chez les rattes traitées par HCTZ (0.51 ± 0.17 UI/mg de protéine) en comparaison à celles du lot témoin (1.46 ± 0.83 UI/mg de protéine) et une diminution également non significative ($P > 0.05$) du taux de la GSH chez les rattes traitées par le CP (0.54 ± 0.42 UI/mg de protéine) par rapport au groupe témoin (1.46 ± 0.83 UI/mg de protéine)

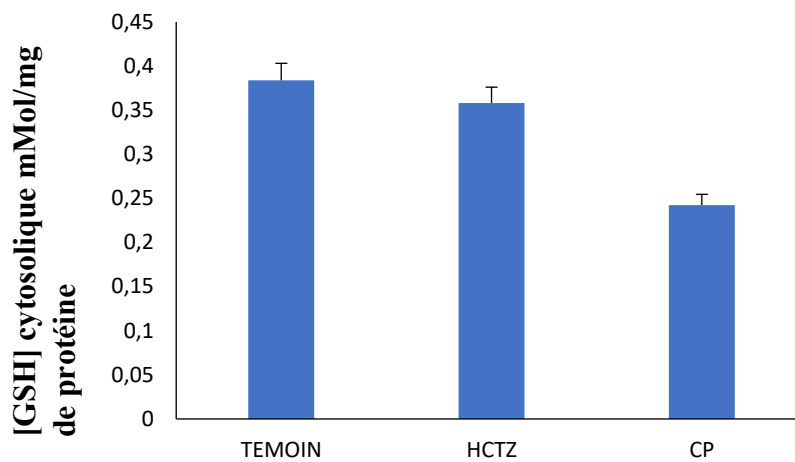


Figure 23 : La représentation graphique du taux de GSH cytosolique hépatique des rattes traitées par 200 mg/kg de l'hydrochlorothiazide et 80 mg/kg de cyclophosphamide par rapport aux rattes témoins

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. (*) indique une différence comparée au témoin négatif. Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$).

D'autre part, on remarque une diminution non-significative des réserves hépatiques de GSH ($P > 0.05$) chez les rattes traitées par l'HCTZ en comparaison avec les rattes témoins avec des valeurs estimées à (0.35 ± 0.13 UI/mg de protéine contre 0.38 ± 0.04 UI/mg de protéine) respectivement. Et une diminution non-significative ($P > 0.05$) du GSH chez le groupe traité par le CP en comparaison au lot témoin avec les valeurs estimées à (0.24 ± 0.14 UI/mg de protéine contre 0.38 ± 0.04 UI/mg de protéine).

Le GSH est considéré comme un biomarqueur particulièrement sensible du stress oxydant, il fonctionne comme un capteur des ROS (Romão et al., 2006). La diminution de la GSH que nous avons obtenue est peut-être due à la formation des ROS qui ont la capacité de consommer la GSH quand elle est importante et que cela conduit à la peroxydation lipidique et l'oxydation des groupement thiols (-SH) des protéines (Belli et al., 2009 ; Attia et al., 2013). Ces résultats de réduction du GSH. Les résultats obtenus pour l'évaluation de stress oxydatif induit par HCTZ sont compatibles à celles de Ribeiro et ses collaborateurs qui ont expliqué ce phénomène par l'existence d'une association entre le stress oxydatif avec l'hypomagnésémie et l'hypokaliémie qui sont des effets secondaires de l'utilisation chronique des thiazides. (Dyckner et al., 1979). Ces résultats sont confirmés par Reungjui et ses collaborateurs que la diminution de GSH par l'HCTZ est un marqueur de stress oxydatif, Le même profil de variation est constaté aussi bien avec l'hydrochlorothiazide qu'avec le cyclophosphamide mais l'augmentation de GSH chez les rattes traitées par le CP est plus élevée que chez les rates traité par HCTZ. Cette augmentation de CP est similaire avec d'autre travaux (Lahouel et al., 2004).

4. Evaluation des paramètres biochimiques du sang :

La variation de la concentration sérique et urinaire de la créatinine, la concentration sérique de TGP, et des triglycérides dans le foie et les reins après administration orale prolongée de l'HCTZ (200 mg/kg) en comparaison avec le témoin positif ayant reçu par voie intra péritonéale de CP à raison de (80 mg/kg) et un lot témoin négatif.

Tableau 4 : variations des paramètres biochimique du sang chez les groupes HCTZ, CP et témoin

	Témoin	HCTZ	CP
TGP (UI/l)	19.07±4.7	23.88±4.08	43.4±0.74
TG (g/L)	2.39±1.16	4.95±1.42*	1.91±0.02(ns)
Créatinine U	2.52±0.99	62.24±28.28*	30.38±26.06
Créatinine P	0.88±0.12	40.48±28.98*	36.2±30*
Clairance rénale(ml/min)	0.09±0.04	0.01±0.001	0.008±0.007

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. (*) indique une différence comparée au témoin négatif. Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$) ; (**) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.01$) ; (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$)

4.1. Le taux sérique de la transaminase glutamate-pyruvate (TGP)

ALAT, ALT ou TGP est une enzyme faisant partie des transaminases dont l'activité est mesurée en biologie clinique lors du bilan hépatique. Elle se trouve en quantité importante surtout dans le foie. Elle catalyse la conversion de l'alanine et de α -cétoglutarate en glutamate et pyruvate et de contribuer au métabolisme de l'azote cellulaire et de la gluconéogenèse hépatique (Brakch *et al.*, 2011)

La figure ci-dessous montrent les résultats des activités enzymatiques de TGP dans le groupe traité par une dose élevé de l'HCTZ (200mg/kg) et dans le groupe de CP (80mg/kg) en comparaison avec le lot témoin.

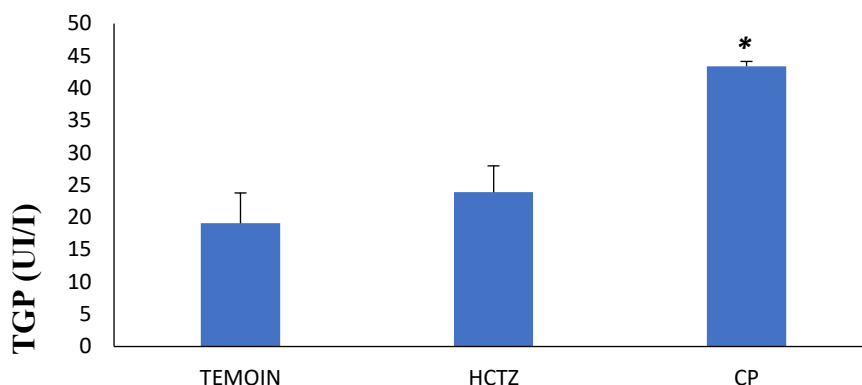


Figure 24 : La représentation graphique de l'activité de la TGP sérique chez les rattes traitées par 200 mg/kg de l'HCTZ et 80 mg/kg de CP par rapport aux rattes témoins

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. () indique une différence comparée au témoin négatif, (#) indique une différence comparée au témoin positif (CP). Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$) ; (**) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.01$)*

Les résultats que nous avons signalé dans notre travail (tableau 4) et ont montré une augmentation non significative ($p > 0.05$) de TGP plasmatique chez les rattes traitées par l'HCTZ (23.88 ± 4.08) par rapport au groupe témoin (19.07 ± 4.7) et une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) dans le groupe traité par le CP (43.4 ± 0.74) en comparaison avec le groupe témoin (19.07 ± 4.7).

Nos résultats sont compatibles avec celles de (Ribeiro et al., 2013) qui ont trouvé une augmentation de la peroxydation lipidique hépatique.

En comparaison avec le témoin négatif, le groupe traité par le CP montre une élévation hautement significative de TGP, marqueur important pour l'évaluation des lésions hépatiques puisque leur fuite dans le sérum définit la gravité des dommages au foie. Nous avons trouvé des résultats similaires à ceux obtenu par (Lahouel *et al.*, 2004).

4.2. Le taux sérique des triglycérides

Variations du taux de triglycéride après une administration par voie orale de l'HCTZ (200 mg/kg) et le CP (80mg/kg) par voie intrapéritonéale par rapport au groupe témoin sont représentée dans la figure 25.

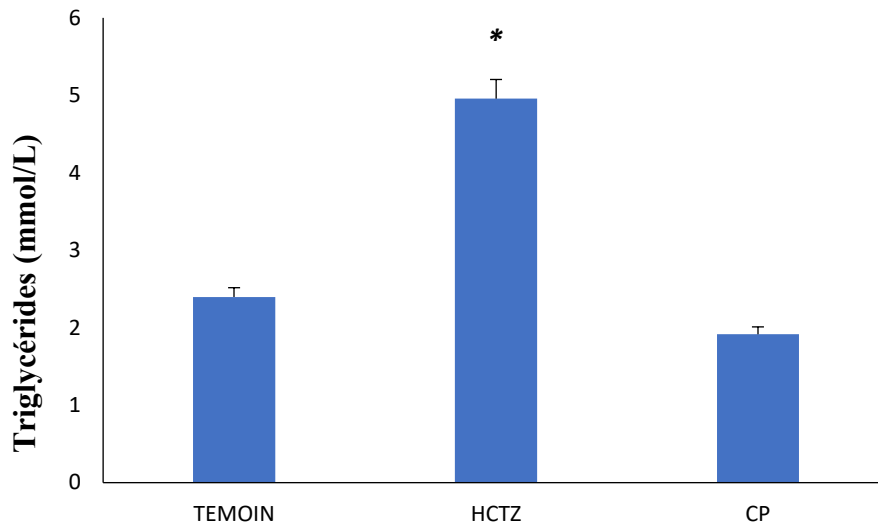


Figure 25 : Teneurs plasmatiques en triglycéride chez le groupe traité par HCTZ (200mg/kg) et par CP (80 mg/kg) en comparaison avec le groupe témoin

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. (*) indique une différence comparée au témoin négatif. Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$)

D'après le tableau 4, Les teneurs plasmatiques en triglycérides montrent une augmentation significative ($p < 0.05$) du taux sérique des triglycérides chez les rattes traitées par l'HCTZ par rapport au témoin (4.95 ± 1.42 contre 2.39 ± 1.16) et une diminution statistiquement non significative ($p > 0.05$) a été notée dans le groupe de cyclophosphamide (1.91 ± 0.02) en comparaison avec le témoin (2.39 ± 1.16).

Il a été démontré par (Ribeiro *et al.*, 2013) qu'un traitement à long terme par l'HCTZ peut altérer la tolérance au glucose et diminuer la sensibilité à l'insuline, accélérant ainsi le développement du diabète sucré. De plus, le traitement par cette molécule a été associé à une augmentation de 5% à 15 % du triglycéride sérique. D'autres études ont également montré l'augmentation du taux de triglycérides provoqué par l'utilisation chronique de l'hydrochlorothiazide. (Brummelen *et al.* 1979 ; Reungjui *et al.*, 2007)

Nos résultats sont en accord avec celle de (Angela *et al.*, 2013) qui ont trouvé aussi une hypertriglycémie, et ils ont expliqué cette élévation par l'exposition chronique à l'angiotensine II qui peut rendre les cellules adipeuses moins efficaces dans leur capacité à stocker adéquatement l'excès de triglycérides, ce qui va entraîner un débordement tissulaire avec des triglycérides.

4.3. Le taux de clairance de créatinine

La figure 26 montre les résultats de mesure de la clairance de créatinine des rates traitées par une l'hydrochlorothiazide (200mg/kg) et les rates traitées par le cyclophosphamide (80mg/kg) en comparaison avec le témoin.

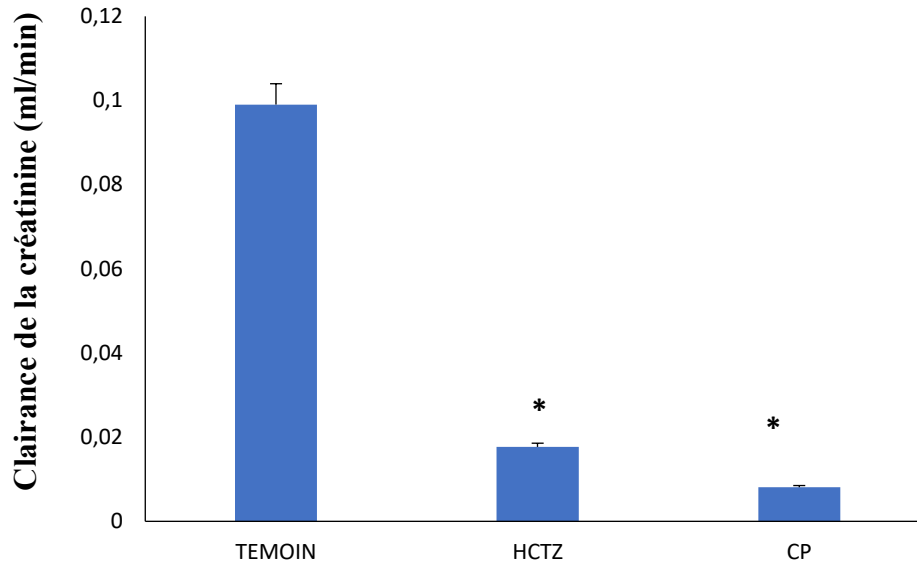


Figure 26 : La représentation graphique du taux de la clairance de la créatinine des rates traitées par 200 mg/kg de l'HCTZ et 80 mg/kg de CP par rapport aux rates témoins.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. (*) indique une différence comparée au témoin négatif. Teste de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$).

D'après le tableau 4, les résultats montrent une augmentation significative ($p < 0.05$) de la concentration en créatinine sérique dans les lots traités par HCTZ (40.48 ± 28.98) et CP (36.2 ± 30) par rapport au lot témoin (0.88 ± 0.12). Nous avons signalé également une augmentation significative ($p < 0.05$) de la concentration en créatinine urinaire dans les lots traités par HCTZ (62.24 ± 28.28) par rapport au témoin (2.52 ± 0.99) et une augmentation non significative ($p > 0.05$) dans le lot traité par le CP (30.38 ± 26.06) en comparaison avec le témoin (2.52 ± 0.99).

Les résultats du bilan rénal ont montré qu'il y'a une hypercréatininémie, on peut expliquer ce résultat par l'endommagement des vaisseaux sanguins des reins, entraînant un dysfonctionnement rénal, cette élévation confirme que l'hydrochlorothiazide a un effet toxique sur les reins durant le traitement, les résultats obtenus dans la présente étude sont similaires à ceux publié par (Ribeiro *et al.*, 2013).

D'après la figure 20, nous avons enregistré une diminution statistiquement non significative ($p > 0.05$) de la clairance dans le groupe de l'HCTZ (0.01 ± 0.001) et le groupe de CP (0.008 ± 0.007) en comparaison avec le témoin (0.09 ± 0.04).

Cette diminution est expliquée par une réduction du débit de filtration glomérulaire, et qui reflète donc la toxicité rénale accrue provoquée par l'hydrochlorothiazide. Ce constat est observé également par (Reungjui et al., 2007) et serait due à l'hypokaliémie provoqué par de l'hydrochlorothiazide.

5. Résultats de l'étude histologique

5.1. Effet de l'HCTZ sur le tissu rénal

La figure suivante montre les résultats des coupes histologiques du rein des rattes traitées par l'hydrochlorothiazide (200mg/kg) et celle traitées avec le cyclophosphamide (80mg/kg) en comparaison aux coupes histologiques des rattes témoins

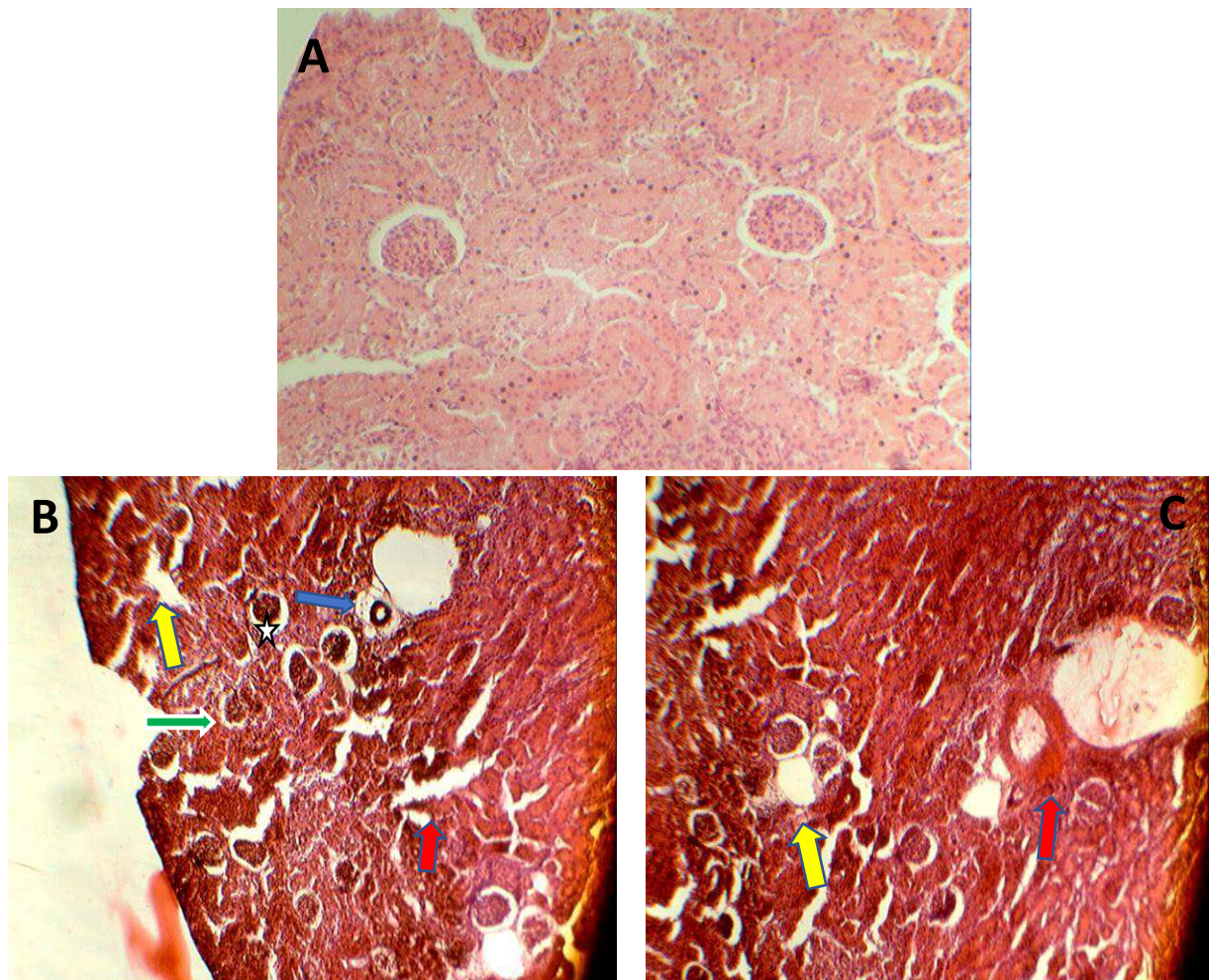


Figure 27 : Observation microscopique d'une coupe histologique rénale des rattes, indique des changements après traitement avec dose de l'HCTZ en comparaison avec le CP et le témoin. (**Photo originale., 2018**). **A** : rein témoin (agrandissement x40). **B** rein après traitement par le l'HCTZ(x40)

Le traitement par l'HCTZ, conduit à des congestions glomérulaires (étoile blanche), une atrophie glomérulaire (flèche bleue), une hypertrophie glomérulaire (flèche verte), une hémorragie (flèche rouge) et une infiltration interstitielle (flèche jaune) (figure 28 B). Une hémorragie (flèche rouge) et une infiltration interstitielle (flèche jaune) ont été également observé (figure 28 C) dans le

groupe traité par le cyclophosphamide. Nos résultats sont similaires à celle obtenu par (Reungjui *et al.*, 2007).

5.1.1. Effet de l'HCTZ sur le tissu hépatique

La figure suivante montre les résultats des coupes histologiques du foie des rates traitées par l'hydrochlorothiazide (200mg/kg) et celle traitées avec le cyclophosphamide (80mg/kg)

Le traitement par l'HCTZ, conduit à des une hémorragie (flèche rouge) et congestion (flèche bleu) (figure 29 A/C). Nous avons observé également une hémorragie (flèche rouge) et dégénérescence des lames hépatocytaires (flèche noire), et une dilatation de veine central (flèche grise) dans le groupe traité par le cyclophosphamide (figure 29 B) Nos résultats sont similaires à celle obtenu par (Mansour *et al.*, 2017).

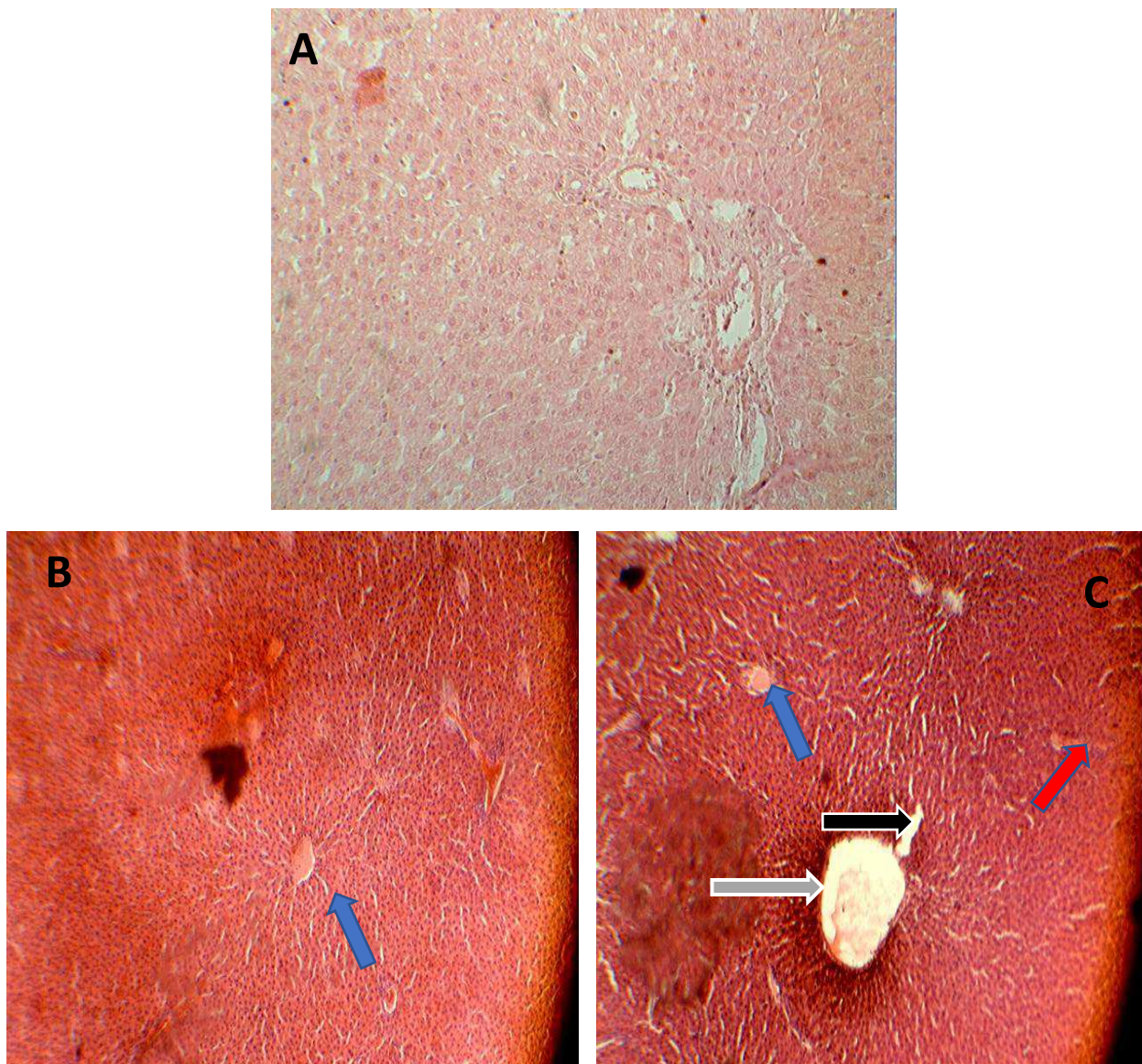


Figure 28 : Observation microscopique d'une coupe histologique hépatique des rattes, indique des changements après traitement avec dose de l'HCTZ en comparaison avec le CP et le témoin. (**Photo originale., 2018**).

A : foie témoin (agrandissement x40). **B** foie après traitement par le l'HCTZ(x40) **C** foie après traitement par le CP (x40).



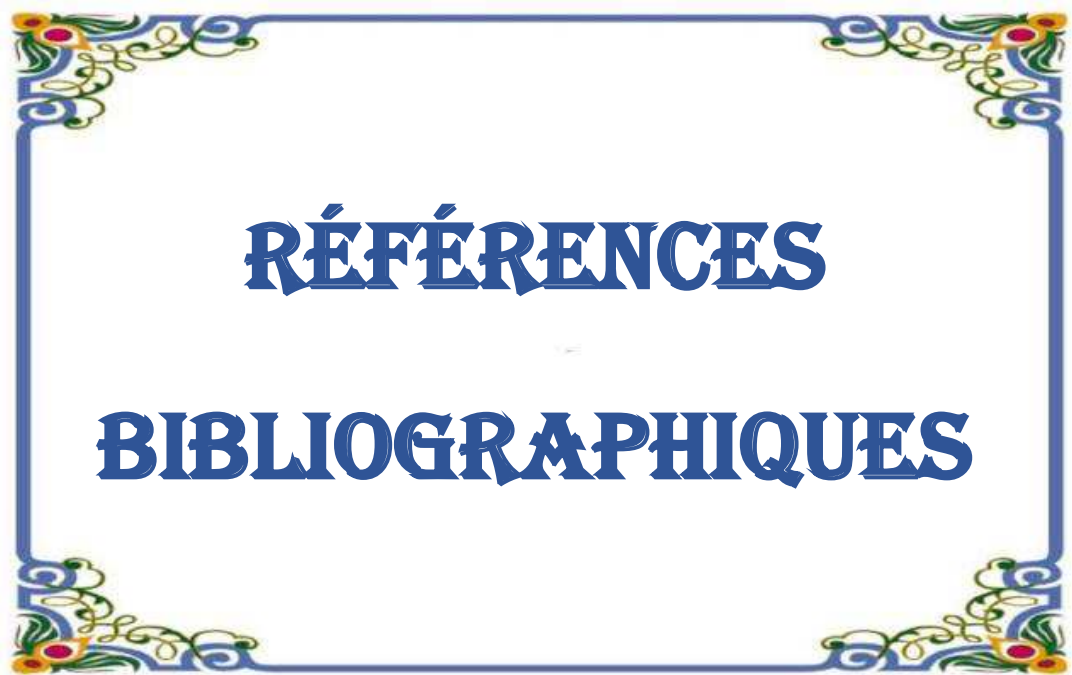
CONCLUSION

Le peu d'études in vivo effectuées sur le médicament diurétique à l'activité anti-hypertensive, l'hydrochlorothiazide, a montré sa susceptibilité à provoquer un déséquilibre entre les pro-oxydant et les antioxydants de l'organisme, en provoquant ainsi un stress oxydatif au niveau du foie et du rein.

Les résultats de notre recherche, s'inscrivant dans le cadre d'un projet avec l'entreprise pharmaceutique Saïdal, ont montré qu'en effet l'utilisation d'une dose quotidienne élevée de l'hydrochlorothiazide de 200 mg/Kg pendant de 15 jours entraîne des modifications biochimiques des fonctions hépatiques et rénales traduites par une augmentation des transaminases et les triglycérides et en même temps une augmentation de créatinine plasmatique ; en effet la clairance se trouve diminuée de manière significative. Comparé au cyclophosphamide, médicament de référence pour ses effets génotoxiques, l'hydrochlorothiazide induit un stress oxydatif cellulaire aussi bien dans le foie que dans le rein. Modéré dans le foie, le stress oxydatif est plus prononcé dans le rein. Il serait secondaire à la déplétion du système antioxydant notamment le glutathion et la catalase cytosoliques.

Le processus oxydatif est clairement objectivé par l'augmentation des taux de manoldialhédyle (MDA) issus de la peroxydation des lipides membranaires des cellules hépatiques et rénales. Le résultat est corroboré par l'augmentation des activités transaminases (TGP), enzymes à localisation membranaire dans les cellules du foie.

Toutefois, d'autres études plus approfondies avec des différentes doses et différents délais d'observation sont nécessaires pour mieux appréhender les mécanismes de toxicité des médicaments en général et de l'hydrochlorothiazide en particulier. Il serait souhaitable de mettre en évidence la relation entre le stress induit par les médicaments et leurs génotoxicité potentielle.



RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- **Aeschlimann C, Kupfer A, Schefer H, Cerny, T. (1998).** Comparative pharmacokinetics of oral and intravenous ifosfamide/mesna/methylene blue therapy. *Drug Metab Dispos*, 26 : 883–890.
- **Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev Rhum* ; 74 : 636-643.
- **Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM, (1993).** Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7915-7922.
- **Andreyev AV, Kushnareva YE, Starkov AA.** Mitochondrial Metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry*, 2005 ;70 (2) :200-214.
- **Angela LP, Ildiko L, Edward WS, Jaime W, Ronald GV, Lidia SS, (2013)** The metabolic cost of lowering blood pressure with hydrochlorothiazide. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 5 :35.
- **Anon. (1987).** Uric acid in hypertension. *Laet*, i, 1124-1125.
- **Arizon Z, Alexander P, Berner Y, (2004)** Hydrochlorothiazide induced hepatostatic liver injury. *Age and Aging* ,33 :509-510.
- **Atli GA, Alptekin O, Tuke S, Canli, (2006).** Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , And Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish or eochromis niloticus. *Comp.biochem physiol.* 143 : 218-224.
- **Attia AMM, Ibrahim FAA, Nabil GM, Aziz SW, (2013).** Antioxidant effect of ginger (*zingiber officinale roscoe*) Against lead acetate-induced hepatotoxicity in rats. *African Journal of pharmacy and pharmacology* 7(20) : 1213-1219.
- **Backman L, Beermann B, Groschinsky-GridM, Hallberg D. (1979).** Malabsorption of hydrochlorothiazide following intestinal shunt surgery. *Clin. Pharmacokinet*, 63-68.
- **Baggio B, Gambaro G, Marchini F, Cicerello E, Tenconi R, Clementi M, Borsatti A. (1986).** An inheritable anomaly of red-cell oxalate transport in 'primary' calcium nephrolithiasis correctable with diuretics. *New Engl. J Med.*, 314, 599-60 .
- **Bansale K, Modak B, Torres R. (2001).** Identification of the molecular basis of doxorubicin induced cardiotoxicity. *Nat Med* ; 18 : 1639.

- **Barbagallo M, Dominguez LJ, Galioto A, Ferlisi A, Cani C, Malfa L, Pineo A, Busardo A, Paolisso G (2003).** Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. *Mol Aspects Med* ; 24 : 39-52.
- **Barbhaiya RH, Graig WA, Correck-West HP, Welling EG. (1982).** Pharmacokinetics of hydrochlorothiazide in fasted and nonfasted subjects: A comparison of plasma level and urinary excretion methods. *J. Pharm. Sci.*, 71, 245-248.
- **Barnhart E. (1989)** Physician' Desk Reference, 43rd ed., Oradell, NJ, Medical Economics, p. 314.
- **Bayern AJ, Garag R, Browne S, Pathy MSJ. (1986).** Plasma electrolytes in elderly patients taking fixed combination diuretics. *Postgrad. med. J.*, 62, 159-162.
- **Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W, (1993).** Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*; 16: 125–131.
- **Beaudry C, Laplante L, (1973) :** severe allergic pneumonitis from hydrochlorothiazide. *Ann intern Med* 78 : 251
- **Beck ML, Cline JF, Hardman JR, Racela LS, Davi JW. (1984).** Fatal intravascular immune hemolysis induced by hydrochlorothiazide. *Am. J. clin. Pathol.*, 81, 791-794
- **Beermann B, Groschinsky-Grid M, Rosen A. (1976).** Absorption, metabolism and excretion of hydrochlorothiazide. *Clin. pharmacol. Ther.*, 19, 531-537.
- **Beermann B, Groschinsky-Grid M. (1978).** Gastrointestinal absorption of hydrochlorothiazide enhanced by concomitant intake of food. *EuT. J. clin. Pharmacol.*, 13, 125-128
- **Belli N, Lahouel M, Chebab S, Tekouk M, Leghouchi E, 2009.** Stress oxidant induit par la coexposition au plomb et au cadmium : deux contaminants des eaux souterraines d'Oued Nil (Jijel-Algérie). *Water science*, 23(3) :289-301.
- **Boddy AV, Yule SM. (2000).** Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines. *Clin Pharmacokinet*, 38 :291–304
- **Bonner G. (1994).** Hyperinsulinemia, insulin resistance, and hypertension, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 24 39–49.
- **Bonsnes RW, Taussky HH. (1945).** On the calorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. *J. Biol. Chem.*, 158 581-591.

- **Boveris A, Oshino N, Chance B (1972).** The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617-630.
- **Bradford MM A (1976).** Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 248–254
- **BrakchN, Kessler D. (2011).** Enzymes hépatiques, P. 3.
- **Brummelen P van MD, Gevers Leuven JA MD, van Gent CM Ph D. (1978)** Influence of hydrochlorothiazide on the plasma levels of triglycerides, total cholesterol and HDL-cholesterol in patients with essential hypertension, *Curr. Med. Res. Opin.* ; 6,24.
- **Carange J. (2010).** Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection ? Thèse de doctorat. *Université du Québec Trois-Rivières.*
- **Carr A. Frei B. (1999).** Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions *FASEB J.* 13(9), 1007-1024.
- **Carfagna MA, Ponsler GD, Muhoberac BB (1996).** Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals. *Chem Biol Interact;* 100: 53–65.
- **Césarini JP. (2004).** Le sélénium : actualités. John Libbey Eurotext Edition, p 14.
- **ChhipaRR, Singh S. (2006).** Doxycycline potentiates antitumor effect of cyclophosphamide in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 202 :268–77.
- **Chritensson, 1 : Hällström, K. & Wengle, B. (1977)** Hypercalcemia and priary hyperparathyroidism. Prevalence in patients receivig thiaides as detected in a health scenen. *Arch. intem. Med.*, 137, 1138-1142
- **Christophe P, Christophe S. (2011).** Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. Edition Springer, p 84.
- **Cheng P, Xiaobo W, Jingnan Ch, Rui J, Lijun W, YukMan L, Yuanyuan Z, Yuwei L, Lin L, Ka Ying M, Yu H, Zhen-Yu Ch, (2014).** Biology of Ageing and Role of Dietary Antioxidants. *BioMed Research International*, Article ID 831841, 13 pages
- **Clairbone A, (1985).** Catalase activity. In *CRC, Handbook of Methods for oxygen Radical research* (Ed.RA) Greenwald). CRC Press Boca Raton FL: 283-284.

- **Cornish AL, McClellan JI, Johnston DH. (1961).** Effects of chlorothiaide on the pancreas. *New Engl. J. Med.*, 265,673-675.
- **Cornus J. (2010).** Valeurs usuelles en biochimie sérique chez le cheval selle français : données du laboratoire biochimique de l'ENVA., Thèse pour le doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, P. 11.
- **Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. (1992).** A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7370-7374
- **Damian G, Elizabeth A, Judith M, Ruth R, (2012).** Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of Toxicology.* Article, P :13
- **De Jonge ME, DR Huitema, A Rodenhuis, S Beijnen JH. (2005).** Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. *Clinpharmacokinet*, 44 (11) : 1135-1164.
- **De Robertis E D P, De Robertis E M F. (1983).** Biologie cellulaire et moléculaire. Presses Université Laval, p 287.
- **Deppeler HP. (1981).** Hydrochlorothiazide. *An. Profile Drug Subst.*, 10, 405-441
- **Dhanesha F, Hayami S, Haruna S, Ogiri Y, Tanaka K, Yamada Y, Ikeda K, Yamada H, Sugimoto H, Kawai N, Kojo S. (2015).** In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamin C and vitamin E and level of lipid hydroperoxides in rats, *Journal of agricultural and food chemistry*, ;48 : 1462-1465.
- **Dina F, Dalia O, Rasha E. (2017).** Genistein Ameliorates Cyclophosphamide - Induced Hepatotoxicity by Modulation of Oxidative Stress and Inflammatory Mediators. *Journal of Medical Sciences*; 5(7):836-843
- **Doucet A (1988).** Function and control of Na⁺-K⁺-ATPase in single nephron segments of the mammalian kidney. *Kidney Int*; 34: 749-760
- **Droge W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.
- **Dutta-roy AK. (1999).** Molecular Mechanism of Cellular Uptake and Intracellular Translocation of α -Tocopherol: Role of Tocopherol-binding Proteins. *Food and Chemical Toxicology* 37, 967-971.

- **Dyckner T, Wester PO. (1979)**, Ventricular extrasystoles and intracellular electrolytes before and after potassium and magnesium infusions in patients on diuretic treatment, *Am. Heart* 97 (1979) 12–18.
- **Ebstein, JE, Wintroub BU. (1985)**. Photosensitivity due to drugs. *Drgr*, 30, 42-57.
- **Edeas M. (2005)**. Les secrets de santé du thé : c'est naturel, c'est ma santé. Alpen Editions s.a.m., p 18.
- **Eisner E, Crowell EB. (1971)**. Hydrochlorothiazide-dependent thrombopenia due to IgM antibo, *J Am. med. Assoc.*, 215, 480-482.
- **Esra E, Ismet C, Sibel S, Omur B (2016)**. An investigation of the mutagenic activity of salamide a major impurity of hydrochlorothiazide, *Toxicology Mechanisms and Methods*. 26,644-649.
- **Fabrizio T, Franca DN, Andrea B, Laura F, Stefano P, Alessandro C, Elisabetta G, Pierangelo Ch, Nicola P, (2010)**. Acute hepatocellular and cholestatic injury during therapy with hydrochlorothiazide -clinicohistopathologic findings : a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 4 :332
- **Fain O. (2004)**. Mise au point : Carences en vitamine C. *La revue de médecine interne* 25, 872–880.
- **Flamenbaum W. (1983)**. Metabolic consequences of antihypertensive therapy. *Ann. Intern. Med.* 98 :875-880
- **Freeman BA, Young SL, Crapo JD (1983)**. Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J Biol Chem* 258, 12534-12542.
- **Freis ED. (1986)**. The cardiovascular risks of thiazide diuretics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 39~239-244.
- **Gilbert CJ, Petros WP. (1998)**. Pharmacokinetic interaction between ondansetron and cyclophosphamide during high-dose chemotherapy for breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 42 : 497–503.
- **Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. (2001)**. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases : the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40 : 959-975.

- **Goren MP. (1996).** Oral administration of mesna with ifosfamide. *Semin. Oncol*, 23:91–96
- **Guidot DM, Repine JE, Kitlowski AD, Flores SC, Nelson SK, Wright RM, McCord, JM. (1995).** Mitochondrial respiration scavenges extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism. *The Journal of Clinical Investigation* 96, 1131-1136.
- **Grandjean D. (2005).** Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien. *Le Nouv Prat Vét* 22, 11-15
- **Greff M. (2011).** Post'U FMC-HGE: Paris, du 24 au 27 mars 2011. Springer Edition, p 39.
- **Gregus Z, Fekete T, Halaszi E, Klaassen CD, (1996).** Lipoic acid impairs glycine conjugation of benzoic acid and renal excretion of benzoylglycine. *Drug Metab Dispos* 24, 682-688.
- **Griffing GT, Sindler BH, Aurecchia S.A, Melby JC (1983).** The effects of hydrochlorothi-azide on the renin-aldosterone system. *Metabo-lism* 32 :197-201
- **Halliwell B, Gutteridge JMC. (1986).** Oxygen free radicals and iron in relation to biology and médecine : some problem and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 501-514.
- **Halliwell B, Gutteridge JM (1990) :** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease.*an overview. Methods Enzymol, 186 :1-85.*
- **Halliwell B (1994) :** Free radicals, antioxidants, and human disease : curiosity, cause, or Conséquence ? *Lancet, 344(8924) :721-724.*
- **Hardwick N, Sae N. (1986)** Patterns of dermatology referrals in a general hospital. *Br L Dermol.*, 115, 167-176.
- **Harrison R, (2002).** Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now *Free Radic Biol Med* 33, 774-797.
- **Heinonen OP, Slone D, Shapiro S. (1977).** *Birth Defects and Drugs in Pregnancy*, Utterton, MA, Publishing Sciences Group, pp. 371-376.
- **Hollifield JW. (1986).** Thiazide treatment of hypertension : effects of thiazide diuretics on serum potassium, magnesium, and ventricular ectopy, *Am. J. Med.* 80 8–12.
- **Houlot R. (1984).** *Techniques d'histopathologie et cytopathologie.* Maloine, 1984 : 19-21 : 225-227.

- **Hulbert AJ, (2005).** On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* 234, 277- 288.
- **Herman LL, Bhimji SS, (2017).** Hydrochlorothiazide. In : StatPearls (Treasure Island (FL)).
- **Hsieh PS, Yen JH, (2011).** Impact of liver diseases on the development of type 2 diabetes mellitus. *World J Gastroenterol.* 7(48) : 5240–5245.
- **Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K (2003).** Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 2003, 10(23):2495-2505.
- **IARC (1987) /AC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monograph Volume 1 to 42, Lyon, pp. 349-350.**
- **IMS Health (2012).** National Disease and Therapeutic Index (NDTI). Plymouth Meeting, Pennsylvania : IMS Health; 2005–12. Available from: <http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth>
- **IQBAL M, SHARMA Y. OKAZAKI M. JUJISAWA, OKADA S (2003).** Dietary supplementation of curcumin enhanced antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: Possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicocyt. *Pharmacol. Toxicol.*, 92, 33-38.
- **Ji LL., Fu R., Mitchell EW., (1992).** Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle : effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol.*73, 1854-1859.
- **Joanne Bourgeois, Yves Gariépy, Jean-Yves Julien, Janine Matte. (1977).** Diurétiques In : Précis de pharmacologie, édition du nouveau pédagogique INC.Canada, pp :253-272
- **John R. Bucher, Ph.D., (1989).** Toxicology and Carcinogenesis Studies of Hydrochlorothiazide in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies) p.14 Technical Rpt Series.357. 89-2812.
- **Jorgensen PL (1986).** Structure, function and regulation of Na⁺/K⁺/ATPase in the kidney. *Kidney Int ; 29 : 10–20.*

- **Kerbusch. (2001).** Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamic of ifosfamide and its metabolites. *Clinical pharmacokinetics*, 40 (1) : 41-62
- **Kim GH, Na KY, Kim SY, Joo KW, Oh YK, Chae SW. (2003).** Up-regulation of organic anion transporter 1 protein is induced by chronic furosemide or hydrochlorothiazide infusion in rat kidney. *Nephrol Dial Transplant*, 18(8) :1505–11.
- **Klimiuk PS, Davies M, Adms PH. (1981)** Prary parathyroidism and thiaide diuretics. *Postgrad. med. J.*, 57,80-83.
- **Krause KH., (2004).** Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57, S28-29.
- **Krinsky NI. (1989).** Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med* 7, 617-635.
- **Kumari M, Rajak S, Singh SP, Murty US, Mahboob M, Grover P, Rahman MF, (2013).** Biochemical alterations induced by acute oral doses of iron oxide nanoparticles in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 36, 296-305.
- **Lacolley P. (2007).** Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. Edition John Libbey Eurotext, p 312.
- **Laguerre M, J. Lacomte, P. Villeneuve (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.* 46 pp. 244-282
- **Lahouel M, Ouadi O, Khiari N (1998).** Effets hépatique et hématologique du paracétamol. *Saidal info*; 7:60–6.
- **Lahouel M, Boutabet K, Kebssa W, Alyan M, (2010).** Polyphenolic fractions of algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxydative stress. *African Journal of pharmacology*, ; 4(10) : 712-720
- **Laroche MG, Rousslet F, (1990).** Les animaux de laboratoire. Ethique et bonnes pratiques. Paris : Masson : p 393.
- **Linton, A.L., Clark, W.E, Driedger, A.A., Thrbull, D.I. & Lidsay, R.M. (1980).** Acute interstitial nephritis due to drugs. *An. intem. Med.*, 93, 735-741.
- **Liu J, Qu W. Kadiiska B.M. 2009.** Role of oxidative stress in cadmium toxicity and cacinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238(3) :209-214.

- **Marfak A.** Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux avec les issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat de l'université de limoges. Spécialité : Biophysique, 2003 ; pp : 6-34.
- **Marklund S, Marklund G, (1974).** involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J biochem*, 47 :469-474.
- **Marnett L.J., (1999).** Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424, 83-95.
- **Massy Z. (2006).** Le cholestérol : le suivi du patient à l'officine. Wolters Kluwer France Edition, p 66.
- **Matsumoto OA, Fridovich I.** Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria.;276(42):38388-93.
- **McEvoy G.K. (ed.) 2002.** American Hospital Formulary Service- Drug Information. *Bethesda, MD : American Society of Health-System Pharmacists, Inc. 2002 (Plus Supplements).*, p. 2548
- **McMichael MA, (2007).** Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 231, 714-720.
- **Meister A, Anderson ME. (1983).** Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711-760.
- **MicroMedex (2013).** 2.0. Ann Arbor, Michigan : Truven Health Analytics Inc.
- **Miller ME, Cohn RD, Burghart PH (1982).** Hydrochlorothiazide disposition in a mother and her breast-fed infant. *J Pediatr*, 101(5) :789-91.
- **Moffat AC, Osselton MD, Widdop B (2004).** Clarke's Analysis of drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material, third edition. Pharmaceutical Press, London, p1109-1110.
- **Morel Y, Mermoud N, Barouki R (1999).** An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression : role of H₂O₂ and NFI. *Mol Cell Biol* 19, 6825-6832.
- **Moore MJ. (1991).** Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet*, 201 : 194-208.

- **Moussard C. (2006).** Biochimie structurale et métabolique, Edition De Boeck Supérieur, p 336.
- **Murray RL, (1984a).** Alanine aminotransferase. In : Kaplan LA and Pesce AJ. Eds. Clinical chemistry theory, Analysis and correlation. St Louis. Toronto. Princeton : the C. V. Mosby Company 1984a : 1088-1090.
- **Nicolas V, Costrini M D, Ph William M, Thomson MD. (1979).** Insuffisance cardiaque congestive In : manuel de thérapeutique médicale, 22^{ème} édition américaine, université de Washington faculté de médecine St-Louis, Missouri, pp :91-111.
- **O'Neil MJ. (2001).** The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 13th ed. Whitehouse Station (NJ) : Merck & Co., Inc.
- **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, (1979).** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem; 95(2): 351-358.
- **Okado-Matsumoto, Fridovich I., (2001).** Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. J Biol Chem 276, 38388-38393.
- **Osterberg RE, See NA. (2003).** Toxicity of excipients. a Food and Drug Administration perspective. Int. J. Toxicol. 22, 377–380.
- **Osterberg RE, Demerlis CC, Hobson DW, McGovern TJ. (2011).** Trends in excipient safety evaluation. Int. J. Toxicol. 30, 600–610.
- **Overlack A. ; Stumpe KO, Muller HM, Kolloch R, Higuchi M. (1982).** Interactions of diuretics with the renal kallikrein-kinin and prostaglandin systems. Klin. Wochenschr. 60 :1223-1228.
- **Packer L, Eric HWH, JürgenTritschler, (1995).** Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, Pages 227-250
- **Paloyan E, Pickleman J. (1969).** Hyperparathyroidism coexisting with hypertension and prolonged thiazide administration. Am. med. Assoc., 210, 1243-1245.
- **Pamplona R, Portero OM, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A, Barja G, (2000).** Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. Mech Ageing Dev 112, 169-183.
- **Papazian L, Roch A. (2008).** Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, Edition Springer, p 153.

- **Patel RB, Patel UR, Rogge MC, Shah VP, Prasad VK, Selen A. (1984).** Bioavailability of hydrochlorothiazide from tablets and suspensions. *J Pharm Sci*, 73(3):359–361.
- **Pickkers P, Garcha RS, Schachter M, Smits P, Hughes AD. (1999).** Inhibition of carbonic anhydrase accounts for the direct vascular effects of hydrochlorothiazide. *Hypertension.*; 33:1043–1048.
- **Poirier J. (2004).** L'indispensable pour vivre en santé, Edition Merlin, p 72.
- **Porter RH, Cox BG, Heaney D, Hostetter 1H, Stinebaugh BJ, Suki WN. (1978)** Treatment of hyperparathyroid patients with chlorthalidone. *New Engl. J Med.*, 298, 577-581.
- **Powers SK, Jackson MJ. (2008).** Exercise-induced oxidative stress : cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88, 1243-1276.
- **Rayman MP. (2012)** Selenium and human health, *Lancet* 379 (9822) 1256–1268.
- **Reed BR , Huff JC, Jones SK, Orton W, Lee LA, Norr DA. (1985)** Subacute cutaneous lupus erythematosus assoated with hydrochlorothiazide therapy. *An. intern. Med.*, 103,
- **Reynolds JEF, ed. (1989)** Marindale. The Extra Pharmacopoeia, 29th ed., London, The Pharmaceutical Press, pp. 991-993
- **Reungjui S, Hu H, Mu W. Roncal CA, Croker BP. Patel Nakagawa JM, Srinivas T, Byer, K Simoni et al. (2007).** Thiazide-induced subtle renal injury not observed in states of equivalent hypokalemia. *Kidney Int.* 72, 1483–1492.
- **Ribeiro MC, Avila DS, Barbosa NB, Meinerz DF, Waczuk EP, Hassan W, Rocha JB, (2013).** Hydrochlorothiazide and high-fat diets reduce plasma magnesium levels and increase hepatic oxidative stress in rats. *Magnes. Res.* 26, 32–40.
- **Ribeiro MC, Barbosa NB, de Almeida TM, Parciannelo LM, Perottoni J, Avila DS, Rocha JB., (2009).** High-fat diet and hydrochlorothiazide increase oxidative stress in brain of rats. *Cell Biochem. Funct.* 27, 473–478.
- **Robertis EDP, De Robertis, EMF. (1983).** Biologie cellulaire et moléculaire. *Presses Université Laval*, p 287.
- **Romão I, Tovar J, Fonesca SG, Moraes RH, CRUZ AK, Hothersall JS, Noronha-dutra AA, Ferreira SH, Cunha FQ. (2006)** Gluthatione and the redox control system

trypanothione/trpanothionereductase are involved in protection of leishmania spp. Against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Braz J Med Biol Res*, ; 39(3) : 355-363

- **Ronald RW, Victor R.P (2013).** « Biochemical Mechanisms of Fatty Liver and Bioactive Foods: Fatty Liver, Diagnosis, Nutrition Therapy » (chp.41) in *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease*.USA: Academic press,P. 623–655
- **Rondeau P. (2009) :** Stress oxydant et glycation : relation structure et activité biologique de l'albumine in vivo et in vitro dans le cadre de la pathologie diabétique. Saint-Denis
- **Rousseau. (2014).** Mise au point d'une suspension buvable d'hydrochlorothiazide. Thèse de doctorat Université de POITIERS.
- **Rowe JW, Tobin JD, Rosa RM, Andres R (1980).** Effect of experimental potassium deficiency on glucose and insulin metabolism. *Metabolism*; 29: 498-502.
- **Roydhouse, N. (1974)** Vertigo and its treatment. *Drugs*, 7, 297-309.
- **Sedlack et Rayond, (1967).** Les aflatoxins dans les cereals et les aliments prêts à la consommation en Cameroun. *aupelf-ured, Fds John libbey eurotox*. Paris ; p 157-163.
- **Scully RE, Mark EJ, McNeely BV. (1983)** Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 42-1983. *New Engl. J Med.*, 309,970-978.
- **Sibel G, Adnan A, Varol S , Diler U.A, Ruhi U.** Carvacroattenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat kidney. *Can. J. Physiol. Pharmacol* 1-30.
- **Sies H, (1997).** Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental physiology* 82, 291-295.
- **Skulachev VP., (1998).** Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* 423, 275-280.
- **Solomon R, (1987).** The relationship between disorders of K⁺ and Mg⁺ homeostasis, *Semin. Nephrol.* 7 253–262.
- **Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC, (2001).** A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 276, p :38084-38089.

- **Suckow MA, Karla AS, Ronald PW (2012).** « Clinical Biochemistry and Hematology » (chp.3) in *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents.America :* The American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM),P.57–116
- **Turrens JF. (1997).** Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports* 17(1), 3-8.
- **Turrens JF, Freeman BA, Crapo JD (1982).** Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch Biochem Biophys* 217, 411-421.
- **Vila FJG, Lentz H, Ludemann HD, (1976),** FT~3C nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.72, p. 1063-1969.
- **Weiner ID, CS Wingo (1997).** Hypokalemia : consequences, causes, and correction, *J. Am. Soc. Nephrol.* 8 1179–1188.
- **Whang R, JK Aikawa, (1977).** Magnesium deficiency and refractoriness to potassium repletion, *J. Chronic Dis.* 30 65–68.
- **WHO (2006).** Geneva, Switzerland: World Health Organization *The International Pharmacopedia*, . 4th ed.
- **Yendt E, Guay GR, Garcia DA. (1970).** The use of thiazides in the prevention of renal calculi. *Cano med. Assoc. J.*, 102, 614-620
- **Yu BP. (1994).** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev. Jan;74(1) :139-62*
- **Yufu K, Itho T, Edamatsu R, Mori A, Hirakawa M (1993).** Effect of hyperbaric oxygenation on the Na⁺-K⁺-ATPase and membrane fluidity of cerebrocortical membranes after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurochem Res; 16: 1033–1039.*
- **Zalin AM, Hutchinson CE., Jong M, Matthews K. (1984)** Hypnatraemia during treatment with chlorpropamide and Moduretic (amiloride plus hydrochlorothiazide). *Br. med. J.*, 289, 659
- **Zhang J, Tian Q, Yung Ch S, Chuen Li S, Zhou S, Duan W, Zhu YZ. (2005).** Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. *Drug Metab Rev*, 37 :611-703.

- **Zielinski S, Portner HO, (2000).** Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods : A function of metabolic rate or age. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 125, 147- 160.



ANNEXES

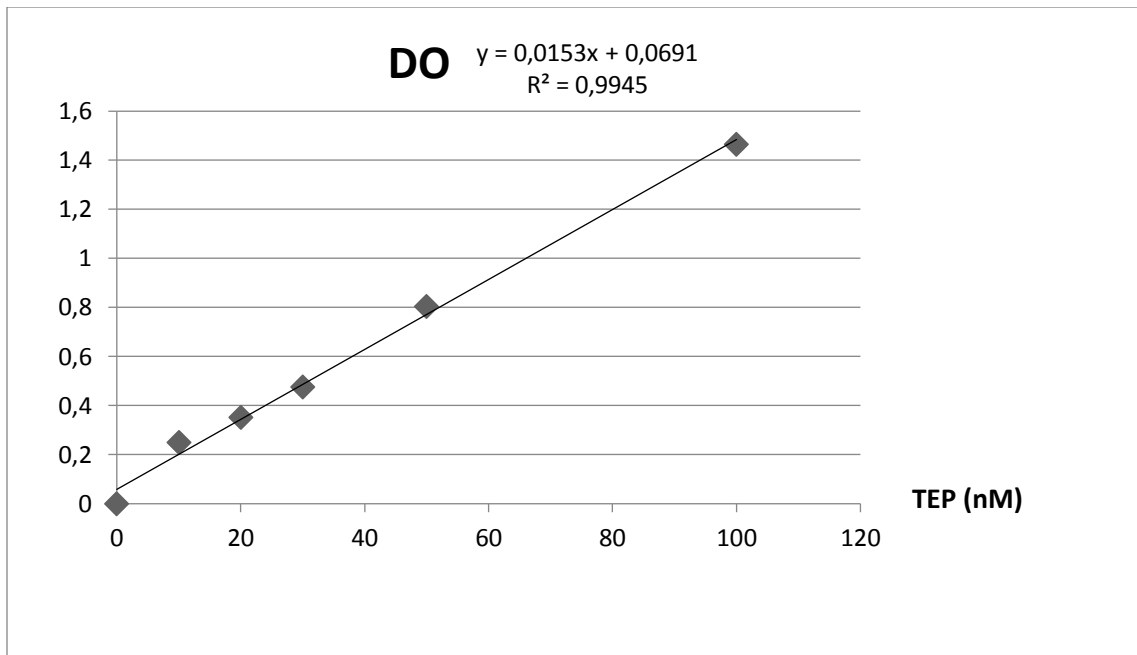


Figure 1: courbe d'étalonnage d'MDA

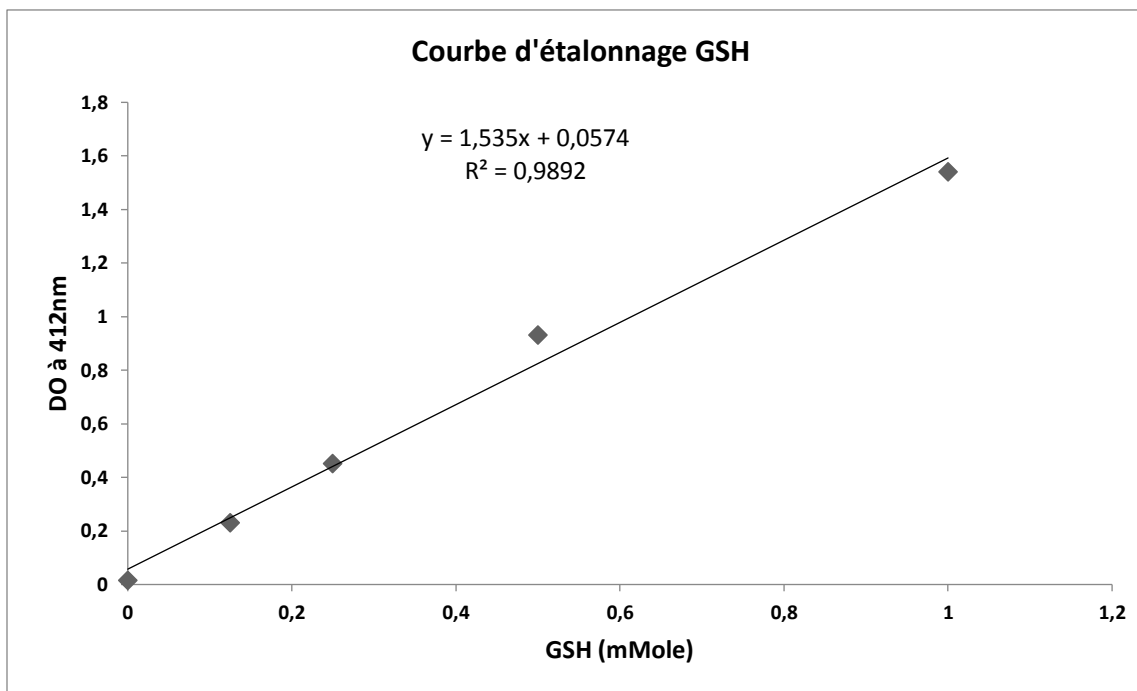


Figure 2: courbe d'étalonnage de GSH

Gamme étalon de protéines

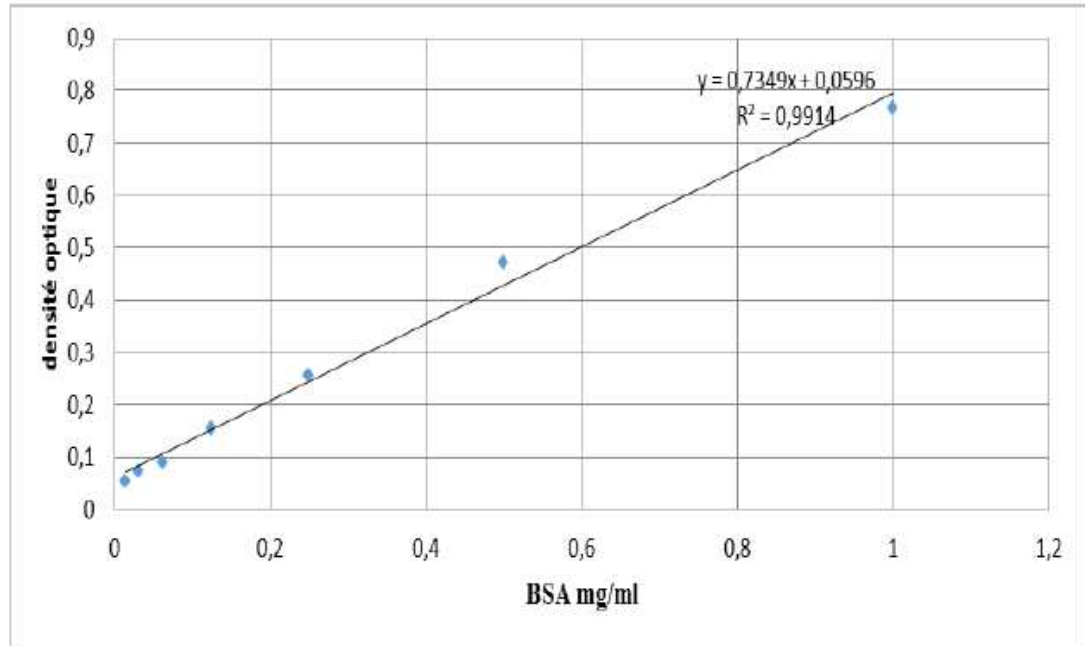


Figure 3 : Courbe d'étalonnage des protéines (sérum albumine bovine).

Présenté par: – SOUIADE Mohamed Hamdi – MESSAHEL Nabila	Encadré par: Pr.LAHOUEL Mesbah
	Date de soutenance 27/06/2018
Theme: Evaluation de stress oxydatif induit par certains médicaments potentiellement génotoxiques	
Master académique en biologie: option biochimie	

Résumé : La toxicité des médicaments est l'objet d'une préoccupation de la santé publique aujourd'hui. L'hydrochlorothiazide est un diurétique thiazidique qui est utilisé comme un agent antihypertenseur. Comme tous les médicaments il a des effets néfastes qu'ils peuvent perturber l'équilibre prooxydant/antioxydant. Cette étude a été menée pour évaluer les altérations biochimiques induites sur le foie et les reins par l'utilisation chronique de l'hydrochlorothiazide chez des rates gésantes à forte dose (200 mg). nous avons utilisé 12 rats répartis en 3 groupes. Le premier groupe contient des rats non traités (témoin négatif). Le deuxième contient cinq rats qui ont été traités par HCTZ, le dernier groupe traité avec une dose toxique (80 mg) de Cyclophosphamide et nous l'avons utilisé comme témoin positif, le traitement prend une période de 2 semaines. Le traitement par HCTZ n'a entraîné aucune modification hépatique alors qu'une altération rénale a été observée par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), après un dosage in vivo de paramètres biochimiques de stress oxydant tels que MDA, GSH et évaluation enzymatique de l'enzyme. l'activité antioxydante telle que la CAT, la SOD plus les paramètres biochimiques sériques TGP, TG, la créatinine plasmatique et l'urine dans le but d'évaluer la clairance rénale. Nous avons également fait une étude histologique pour découvrir l'effet de HCTZ sur les tissus rénaux et hépatiques. Nos résultats suggèrent que la consommation chronique d'une dose de 200 mg de HCTZ provoque des changements métaboliques rénaux qui sont accompagnées avec le développement du stress oxydatif. ces altérations biochimiques, suggérant que ce modèle pourrait être utile pour l'étude de la toxicité métabolique de HCTZ.

Mots clés: hydrochlorothiazide, stress oxydant, cyclophosphamide, ROS, reins, foie

Abstract: The toxicity of drugs is one of the most discussing problems and the subject of public health concern today. Hydrochlorothiazide is a thiazide diuretic drug that is used as an antihypertensive agent. Like all drugs it has its harmful effects that can reach to the disruption of the prooxidant / antioxidant balance. this study was conducted to evaluate the biochemical alterations induced on the liver and kidneys by chronic use of hydrochlorothiazide (HCTZ) in female pregnant rats using a high dose (200mg). we used 12 rats divided to 3 groups. First group contain untreated rats (negative control). Second one contains five rats which were treated by HCTZ, the last group treated with a toxic dose (80 mg) of Cyclophosphamide and we used it as positive control, the treatment operation takes 2 weeks. Treatment with HCTZ led to no hepatic modification while a renal alteration was observed by the production of reactive oxygen species (ROS), after an assay of biochemical oxidant stress parameters in vivo such as MDA, GSH and enzymatic evaluation of the enzyme. antioxidant activity such as CAT, SOD plus serum biochemical parameters TGP, TG, plasma Creatinine and urine for the purpose of assessing renal clearance. We also made a histological study to discover the effect of HCTZ on the renal and hepatic tissues. Our results suggest that chronic consumption of a 200mg dose of HCTZ causes renal metabolic changes that are accompanied with the development of oxidative stress. these biochemical alterations, suggesting that this model might be useful for studying the metabolic toxicity of HCTZ.

Key words: hydrochlorothiazide, oxidative stress, cyclophosphamide, liver, kidney

الملخص: سمية الدواء هي واحدة من أكثر المشاكل التي أثارت الجدل في مجال الصحة العامة في الوقت الحالي. هيدروكلوروثيازيد هو دواء مدر للبول ثيازيد يستخدم كعامل لتخفيض الضغط الدموي. مثل جميع الأدوية لها آثارها الضارة التي يمكن أن تصل إلى خلل في التوازن بين الجذور الحرة والانزيمات المضادة لها المضادة للأكسدة. الغرض من هذه الدراسة هو تقييم السمية المؤثرة على الكبد والكلية من خلال الاستخدام المزمن للهيدروكلوروثيازيد في الجرذان الحوامل باستخدام جرعة عالية (200 ملغ). استخدمنا 12 جرد مقسمة إلى 3 مجموعات. المجموعة الأولى تحتوي على الجرذان غير المعالجة (الشاهد السلبي). المجموعة الثانية تحتوي على خمسة جرذان تعالج ب الهيدروكلوروثيازيد. في حين تم علاج المجموعة الأخيرة بجرعة سامة (80 ملغ) من السيكلوفوسفاميد واستخدامها كشاهد موجب، استغرقت هذه العملية أسبوعين. لم ينتج عن المعالجة باستخدام الهيدروكلوروثيازيد أي تغيرات كبدية في حين نجم عن ذلك تغيرات كلوية لوحظت من خلال إنتاج الجذور الحرة. بعد القيام بقياس بعض مؤشرات الإجهاد التأكسدي كتقييم النشاط الأنزيمي لمضادات الأكسدة بالإضافة إلى المؤشرات البيوكيميائية المصلية. كما أجرينا أيضا دراسة نسيجية لاكتشاف تأثير الهيدروكلوروثيازيد على النسيج الكبدي و الكلوي. من خلال ما حصلنا عليه النتائج تشير إلى أن الاستهلاك المزمن لجرعة عالية (200 ملغ) من الهيدروكلوروثيازيد يسبب تغيرات أيضية كلوية التي يصاحبها تخريب التوازن بين الجذور الحرة والانزيمات المضادة لها المعروفة باسم الإجهاد التأكسدي. من هذه التغيرات البيوكيميائية ، يمكن ان نقترح بأن هذا النموذج قد يكون مفيدا للقيام بدراسة جرعات أخرى لمعرفة سبب هذه السمية وإيجاد حل لتطوير فعالية و سلامة الأدوية.