



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université de Larbi Tbessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Appliquée



MEMOIRE DE MASTER
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie Appliquée

Thème :

**Modulation pharmacologique de la réponse hépatique
induite par des nitrites chez les lapins**

Présenté par :

M^{lle} Khaoula Jouini

Mme Djemaa Rahmani

Devant le jury :

Mr. GOUJIL T

M.C.B

Université de Tébessa

Président

Mme. LAHMER.BELGUENDOZ. K M.A.A

Université de Tébessa

Rapporteur

Mme. TOUMI N

M.C.B

Université de Tébessa

Examineur

Date de soutenance : 24/06/2020

يتواجد النتريت في عدة اشكال، فهو موجود على نطاق واسع في موارد المياه ويستخدم كإضافات ومحافظة للأغذية وكمصدر للون. التعرض لجرعة كبيرة من النتريت يؤدي إلى عكس آثاره المفيدة ويتحول إلى سمية. الهدف من دراستنا هو معرفة تأثير النتريت على استجابة الكبد.

تم تقسيم 24 أرنباً إلى أربع مجموعات. مجموعة شاهدة من ثلاثة أرانب لم تتلق أي علاج. مجموعة (N) من تسعة أرانب تلقت 100 ملغم/كغ من وزن الجسم من نتريت الصوديوم وحده لمدة ستة أسابيع. مجموعة (N+T) من تسعة أرانب تلقت 28 ملغم/كغ من وزن الجسم من tanakan لمدة ثلاثة أسابيع بعد حصولها على نتريت الصوديوم في ستة أسابيع. مجموعة (T) من ثلاثة أرانب تلقت 28 ملغم/كغ من وزن الجسم من tanakan لمدة ثلاثة أسابيع.

تظهر النتائج التي توصلنا إليها أن نتريت الصوديوم يتسبب في تسمم الكبد الذي يظهر من خلال ارتفاع معدلات (TGO et TGP) ،transaminases ،bilirubine totale ،bilirubine directe وG-Glutamyl transférase، ومن شأن استخدام tanakan أن يحسن من حالة الكبد عن طريق خفض المعدلات السابقة.

وقد أظهرت دراستنا أن نتريت الصوديوم و Tanakan لا يؤثران على phosphatase alcaline و albumine.

الكلمات المفتاحية: نتريت مستخلص، الجنكو بيلوبا، استجابة كبد ; ارنب

Nitrites come in several forms; they are widely present in water resources and used as food additives and preservatives and as a source of color. Exposure to high levels of nitrite reverses its beneficial effects and becomes toxic. The purpose of our study is to modulate pharmacologically the hepatic response induced by nitrites.

Twenty-four rabbits were divided into four groups; a control group of three rabbits was not treated, a group (N) of nine rabbits received sodium nitrite alone at 100mg/Kg body weight for six weeks. A group (N+T) of nine rabbits received tanakan at 20mg/Kg body weight for three weeks after receiving sodium nitrite in six weeks. A group (T) of three rabbits received tanakan alone at 20mg/Kg body weight for three weeks.

Our results show that sodium nitrite causes hepatotoxicity, which results in increased serum transaminase (TGO and TGP), total bilirubin and direct bilirubin, and G-Glutamyl transferase levels, and that taking tanakan improves liver status by decreasing the levels of previous parameters.

Our study showed that Sodium nitrite and tanakan do not have an effect on Alkaline Phosphatase and Albumin.

Keywords: nitrite, Ginkgo biloba extract, hepatic response, rabbits.

Les nitrites se présentent sous plusieurs formes ; ils sont largement présents dans les ressources d'eau et utilisés comme additifs et conservateurs pour les aliments et comme source de couleur. L'exposition à une forte dose du nitrite inverse ses effets bénéfiques et devient toxique. Le but de notre étude est de moduler pharmacologiquement la réponse hépatique induite par les nitrites.

Vingt-quatre lapins ont été répartis en quatre groupes ; un groupe témoin de trois lapins n'a reçu aucun traitement, un groupe (N) de neuf lapins a reçu du nitrite de sodium seul à 100mg/Kg du poids corporel pendant six semaines, un groupe (N+T) de neuf lapins a reçu du tanakan à 28mg/Kg du poids corporel pendant trois semaines après avoir reçu du nitrite de sodium dans six semaines, un groupe (T) de trois lapins a reçu du tanakan seul à 28mg/Kg du poids corporel pendant trois semaines.

Nos résultats montrent que le nitrite de sodium entraîne une hépatotoxicité qui se traduit par l'augmentation des taux sériques de transaminases (TGO et TGP), bilirubine totale et bilirubine directe et G-Glutamyl transférase, et que la prise du tanakan fait améliorer l'état du foie en diminuant les taux des paramètres précédents.

Notre étude a montré que Le nitrite de sodium et le tanakan n'ont pas un effet sur la Phosphatase Alcaline et l'Albumine.

Mots clés : nitrite, extrait de Ginkgo biloba, réponse hépatique, lapins.

Dédicaces

Je dédie se travail

A l'âme de ma mère, je demande à dieu d'avoir pitié d'elle.

*A mon cher mari et à toute ma famille et je les remercie pour leurs
complicités et leur soutien moral.*

A mon directeur et mes collègues de travail.

Ainsi qu'à ma Binôme Khaoula et sa famille

*A tous ceux que j'aurais oublié de citer mais qui existent au fond de mon
cœur et de ma pensée.*

DJEMAA

Dédicaces

Je dédie ce travail

*A mes chers parents, pour leur amour, leur soutien et tous leurs
Sacrifices.*

A mes chers frères et à ma petite sœur.

A ma chère binôme Djemaa et sa famille.

A mes amies Zaineb, Aicha, Amel et Hadjer.

*A tous mes amies et les étudiants du Biologie spécialement la promotion
de 2019-2020*

*A tous ceux que j'aurais oublié de citer mais qui existent au fond de mon
cœur et de ma pensée.*

KHAOULA

Remerciement

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de madame LAHMER BELGUNDOUZ Karima, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nous remercions les membres du jury : Mr GOUJIL T. et Mme TOUMI N. pour l'intérêt et le temps qu'ils ont consacré à juger ce mémoire.

Nos remerciements s'adressent à Mr LAHMAR E. pour son aide pratique et son soutien moral et son encouragement.

Nous remercions tout particulièrement Mlle SOUALHIA M. de la pharmacie MESAADI pour sa gentillesse et son aide pour compléter notre travail.

Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenue de près ou de loin

ملخص

Abstract

Résumé

Dédicace

Remerciement

Sommaire

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

Chapitre 01 : Nitrite

I. Nitrite	4
II. Utilisation du nitrite	4
III. Toxicité du nitrite	4
IV. Biotransformation du nitrite	5

Chapitre 02: Ginkgo biloba

I. Ginkgo biloba	7
II. Composants actifs de l'extrait de Ginkgo biloba	10
II.1. Terpènes trilactones	10
II.2. Flavonoïdes	11
II.3. Acide ginkgolique	11
II.4. Ginkgotoxines	11
III. Effets pharmacologiques du Ginkgo biloba	14

Chapitre 03 : Foie

I. Organisation du foie	16
II. Fonction du foie	16
II.1. Fonction de détoxification	18
II.2. Fonction du stockage et de production	18
III. Evaluation de la fonction hépatique	18

Matériel et méthodes

I. matériel biologique	20
------------------------	----

II. Produits administrés	20
II.1. Nitrite de sodium	20
II.2. Tanakan	21
III. Méthode d'élevage et du traitement	
III.1. Elevage	22
III.2. Traitement	22
III.3. Prélèvements sanguins	22
IV. Analyse de la fonction hépatique	23
IV.1. Dosage des Transaminases	24
IV.2. Dosage d'Alcaline phosphatase	24
IV.3. Dosage de G-glutamyl transférase	25
IV.4. Dosage d'Albumine	25
IV.5. Dosage de Bilirubine totale	25
IV.6. Dosage de Bilirubine directe	26
V. Analyse statistique	26
Résultats	
I. Poids corporel	28
II. Rapport hépato-somatique	29
III. Marqueurs de la fonction hépatique	30
III.1. Transaminases	30
III.2. Phosphatase alcaline	31
III.3. G-glutamyl transférase	32
III.4. Albumine	33
III.5. Bilirubine totale	34
III.6. Bilirubine directe	35

Discussion**Conclusion****Bibliographie****Annexe**

Figure	Titre	Page
1	Ginkgo biloba	7
2	Structure chimique du Ginkgolide	8
3	Structure chimique du Bilobalide	8
4	Structure chimique du Flavonoïde	9
5	Structure chimique du l'acide ginkgolique	9
6	Structure chimique de Ginkgotoxine	11
7	Organisation structurale et anatomique du foie	14
8	Coupe d'un lobule hépatique	15
9	Différents types cellulaires composants un lobule de foie	15
10	Interactions biochimiques des xénobiotiques	17
11	Lapin de race <i>néo-zélandais</i>	20
12	Nitrite de Sodium	21
13	Nourriture utilisée dans l'élevage	22
14	Variation des poids des lapins pendant la période du traitement	28
15	Variation du rapport hépato somatique pendant la période du traitement	29
16	Variation du teneur plasmatique en TGO des lapins témoins et traités pendant la période du traitement	30
17	Variation du teneur plasmatique en TGP des lapins témoins et traités pendant la période du traitement	31
18	Variation du teneur plasmatique en APL des lapins témoins et traités pendant la période du traitement	32
19	Variation du teneur plasmatique en GGT des lapins témoins et traités pendant la période du traitement	33
20	Variation du teneur plasmatique en Albumine des lapins témoins et traités pendant la période du traitement	34
21	Variation du teneur plasmatique en Bilirubine totale des lapins témoins et traités pendant la période du traitement	35
22	Variation du teneur plasmatique en Bilirubine directe des lapins témoins et traités pendant la période du traitement	36

ALP	Alcaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransférase
AST	Aspartate aminotransferase
Bb	Bilobalide
EGb	Extrait de Ginkgo biloba
Fig.	Figure
GGT	G-Glutamyl transférase
GKA	Ginkgolide A
GKB	Ginkgolide B
GKC	Ginkgolide C
GKJ	Ginkgolide J
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
LDH	Lactate déshydrogénase
MDH	Malate déshydrogénase
metHb	Méthémoglobine
NADH	Déshydrogénase
NaNO ₂	Nitrite de sodium
NO	Oxyde nitrique
NO ₂ ⁻	Nitrite
NO ₃ ⁻	Nitrate
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OH	Radical hydroxyle
ppm	Partie par million
ROO	Radical peroxy
ROS	Espèces réactives d'oxygène
SOD	Superoxyde dismutase
TTL	Terpène trilactones
TGO	Transaminase Glutamo-oxalo-acétique
TGP	Transaminase glutamopyruvique

INTRODUCTION

Le nitrite (NO_2^-) a été largement appliqué dans les produits agricoles et industriels et est souvent présent dans divers aliments, échantillons biologiques et systèmes environnementaux.

Cependant, le NO_2^- en tant que contaminant toxique menace probablement la santé humaine en produisant des N-nitrosamines hautement cancérigènes (**Guangli et al., 2019**) ce qui peut causer plusieurs problèmes de santé graves, dont le cancer gastrique et œsophagien, le syndrome du nourrisson bleu, l'avortement spontanée et les anomalies congénitales dans le système nerveux central (**Kilfoy et al., 2006**).

Dans l'ancienne Chine, les feuilles et les graines de *Ginkgo biloba* ont été utilisées pour traiter la toux, l'asthme, l'énurèse, l'abus d'alcool, les infections de la peau pyogénique et les infections de vers. On sait que l'extrait de *Ginkgo biloba* contient diverses classes de constituants chimiques, dont les terpénoïdes, les polyphénols, les allyles phénols, les acides organiques, les glucides, les acides gras et les lipides, les sels inorganiques et les acides aminés. Les trilactones et les flavonoïdes de terpène sont considérés comme les principaux constituants bioactifs. (**Zhu et al., 2019**)

Le foie contrôle le métabolisme de la glycolyse et de l'urée, la détoxification du sang et le taux de cholestérol, tout en soutenant les systèmes hématopoïétique et digestif. Étant donné qu'il s'agit de l'organe le plus grand et le plus exposé à la toxine dans l'organisme, il n'est pas surprenant que les maladies du foie, notamment la fibrose, la cirrhose, l'hépatite et l'hépatocarcinome, soient les principaux facteurs de morbidité et de mortalité. (**Gordillo et al., 2015**)

Le nitrite de sodium est utilisé médicalement pour la vasodilatation, la bronchodilatation, le vasospasme cérébral post-hémorragique, l'infarctus du myocarde et comme antidote pour l'empoisonnement au cyanure. Néanmoins, le NaNO_2 est considéré comme un composé toxique en haute concentration car il peut provoquer des troubles physiologiques et des effets néfastes sur la santé, notamment des troubles de la fonction reproductrice, des troubles endocriniens, une hépatotoxicité, un retard de croissance et une dysrégulation des réactions inflammatoires. (**Nagla et al., 2020**)

Dans notre étude, nous avons essayé d'élucider le mécanisme d'action des nitrites et de l'extrait de *Ginkgo Biloba* dans les altérations hépatiques observées lors de l'administration du NaNO_2 par voie orale.

Pour réaliser notre étude nous avons fixé quelque but à attendre :

- ❖ Effet du nitrite sur les paramètres biochimiques de la fonction hépatique.
- ❖ Effet de l'extrait de *Ginkgo Biloba* sur les altérations hépatiques induites par des nitrites.

Chapitre 01 :

Nitrite

I/ Nitrite

Le nitrite est le produit intermédiaire de plusieurs réactions d'oxydation et de réduction impliquées dans les différents processus de transformation de l'azote. **(Burgin et Hamilton, 2008)**. Les nitrites proviennent principalement de composés organiques azotés et de la bioformation des nitrates. **(Guangli et al., 2019)**

En tant que précurseur important, le nitrite peut interagir avec les protéines pour produire des N-nitrosamines hautement cancérigènes, ce qui probablement peut causer plusieurs problèmes de santé graves, dont le cancer gastrique et œsophagien, le syndrome du nourrisson bleu, l'avortement spontané et les anomalies congénitales dans le système nerveux central. **(Kilfoy et al., 2006)**

Le nitrite inorganique a longtemps été considéré comme un produit d'oxydation inerte de NO et un biomarqueur de la formation de NO, malgré certaines indications contraires **(Guangli et al., 2019)**

I.1/ Utilisation

Les nitrites sont essentiellement utilisés comme colorant et agent de conservation des aliments. C'est le cas des viandes et dérivés dans lesquels le nitrite de sodium est ajouté non seulement pour la salaison, mais aussi pour préserver le goût et la couleur rouge de l'hémoglobine qui autrement serait oxydée pour devenir brune. **(Sandarine, 2008)**

Les nitrites sont aussi utilisés dans la manufacture des teintures et du caoutchouc, dans l'industrie textile et photographique. Ils servent aussi d'inhibiteur de corrosion et d'antidote dans des cas d'empoisonnement au cyanure. Dans l'industrie, ils sont utilisés pour transformer des amines en sels de diazonium qui sont des colorants organiques. **(Sandarine, 2008)**

I.2/ Toxicité du nitrite

Le nitrite est très toxique comparativement au nitrate (qui est le produit d'oxydation des nitrites) qui est relativement non toxique. Toutefois, le nitrate ingéré est susceptible d'être réduit en nitrite par les bactéries du tractus gastro-intestinal.

Chez l'humain, l'effet critique lié à l'ingestion directe du NO_2^- et/ou produit par conversion endogène du NO_3^- est la méthémoglobinémie.

La méthémoglobinémie est causée par la capacité réduite du sang à transporter l'oxygène dans l'ensemble de l'organisme. Le nitrite ingéré est absorbé dans le système sanguin et réagit

avec l'hémoglobine dans les érythrocytes pour former la méthémoglobine. Cette molécule résulte de l'oxydation du fer (II) contenu dans la molécule d'hémoglobine en fer (III), ce qui rend inopérant le transport de l'oxygène vers les tissus par l'hémoglobine. **(Julie, 2009).**

Une méthémoglobinémie modérée («30% de l'hémoglobine oxydée) peut provoquer des nausées et des maux de tête, tandis qu'une méthémoglobinémie sévère (>50% de l'hémoglobine oxydée) est susceptible de provoquer la mort. Les concentrations critiques de nitrite et nitrate susceptible d'induire la formation de méthémoglobine chez les humains ont été établies entre 0,3 à 2,5 mg N-NO₂⁻ et 10 à 76 mg N-NO₃⁻ ingérés par kilogramme de poids corporel **(Julie, 2009)**. Des études animales suggèrent que le nitrite peut traverser le placenta ou exercer un effet transplacentaire, de plus amples travaux sont nécessaires afin d'évaluer l'importance de l'ingestion de NO₃⁻ et NO₂⁻ par la mère sur la santé du fœtus. Il est important de mentionner que le nitrite et le nitrate sont classifiés comme possiblement cancérigènes pour l'humain. Des études épidémiologiques ont démontré une association entre la présence de ces ions dans l'eau potable et le cancer de l'estomac. **(Boink et Speijers, 2001).**

I.3/ Biotransformation du nitrite

Dans l'organisme, nitrates et nitrites participent à un inter-échange dynamique : le cycle humain de l'azote. Après que les nitrites soient formés par la transformation bactérienne des nitrates, le mélange nitrates/nitrites entre dans le tractus gastro-intestinal *via* la salive.

Une fois dans le sang, les nitrites sont oxydés par l'hémoglobine en nitrates avec la formation de méthémoglobine (metHb). Les nitrites sont facilement transformés en espèces nitrosantes en environnement acide (particulièrement l'estomac). Ces dernières peuvent réagir avec une panoplie de composés : soit l'acide ascorbique, soit les amines et les amides pour former les composés N-nitrosés **(McColl, 2007)**

La conversion des nitrates en nitrites est dans une grande mesure le fait des bactéries qui logent le tractus buco-gastro-intestinal. Conséquemment, le taux de transformation des nitrates suite à leur ingestion ne dépendra pas seulement de la dose de nitrates ingérés, mais aussi de la quantité et du type de bactéries qui y résident.

Environ 5 à 10% des nitrates absorbés sont convertis en nitrites dans la salive, l'estomac et le petit intestin **(McColl, 2007).**

Chapitre 02:
Ginkgo Biloba

I/ *Ginkgo biloba*

Le *Ginkgo biloba* (*Ginkgoaceae*) est considéré comme la seule espèce d'arbre survivante de l'ordre des Ginkgoales. Il existe depuis environ 280 millions d'années et est utilisé à des fins pharmaceutiques et médicales en Chine depuis plusieurs centaines d'années pour traiter diverses maladies. Toutefois, cette utilisation n'a pas été fondée sur des connaissances scientifiques. Aujourd'hui, les extraits de *Ginkgo biloba* sont devenus l'un des médicaments à base de plantes les plus courants et les mieux explorés (**Christian et al., 2013**).



Figure1 : *Ginkgo biloba* (Mullaicharam, 2013)

Les produits de *Ginkgo biloba* sont aujourd'hui proposés dans de nombreuses préparations différentes parfois sans aucune formation scientifique ni aucun contrôle.

Cependant, en médecine fondée sur des données probantes et dans toutes les études et tous les traitements cliniques, *Ginkgo biloba* ne devrait être utilisé que sous la forme d'extraits standardisés de *Ginkgo biloba* définis par un processus spécial de composition et de fabrication. (**Mdzinarishvili et al., 2007**).

II/ Composants actifs de l'extrait de *Ginkgo biloba*

Le *Ginkgo biloba* contient différents composants tels que les flavonoïdes, les terpènes trilactones, les proanthocyanidines, les acides ginkgoliques, la biflavone, les polyflavones et les ginkgotoxines (**Leistner et Dreweke, 2009**).

Les variations de la quantité des différents composants de la plante sont principalement liées aux périodes de récolte, au processus de séchage et au stockage.

L'EGB standardisé consiste, entre autres, en deux fractions principales ayant des profils pharmacologiques spécifiques :

- ❖ le terpène trilactones (TTL) (ginkgolide A (GKA), B (GKB), C (GKC), J (GKJ) (fig.2) et le bilobalide (Bb) (fig. 3), à une concentration de 5,4 à 6,6 % (GKA, GKB et GKC ensemble de 2,8 à 3,4 % et Bb 2.6 à 3,2 %)

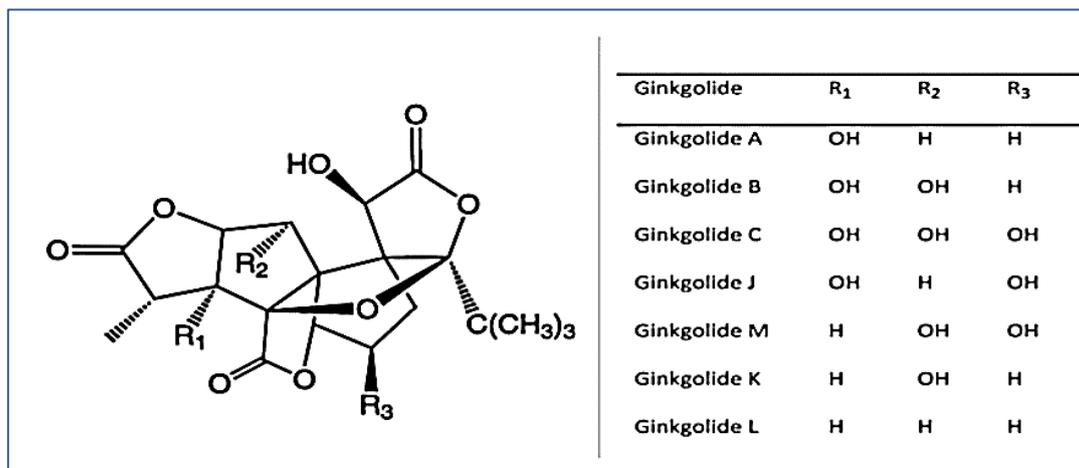


Figure 2 : Structure chimique du Ginkgolide (Nakanishi, 2004)

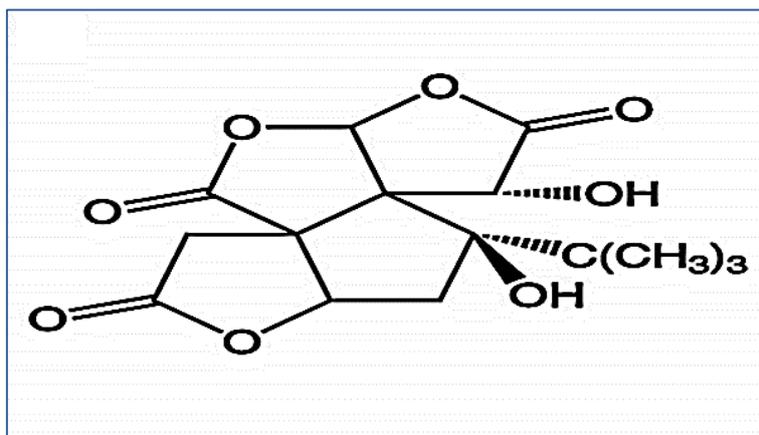


Figure 3 : Structure chimique du Bilobalide (Nakanishi, 2004)

- ❖ les flavonoïdes, qui représentent 22 à 27 % de l'extrait. La fraction flavonoïde est composée principalement de trois flavonols, à savoir la quercétine, le kaempferol et l'isorhamnetine (fig. 4a), qui sont combinés à au moins une fraction de sucre (fig. 4b).

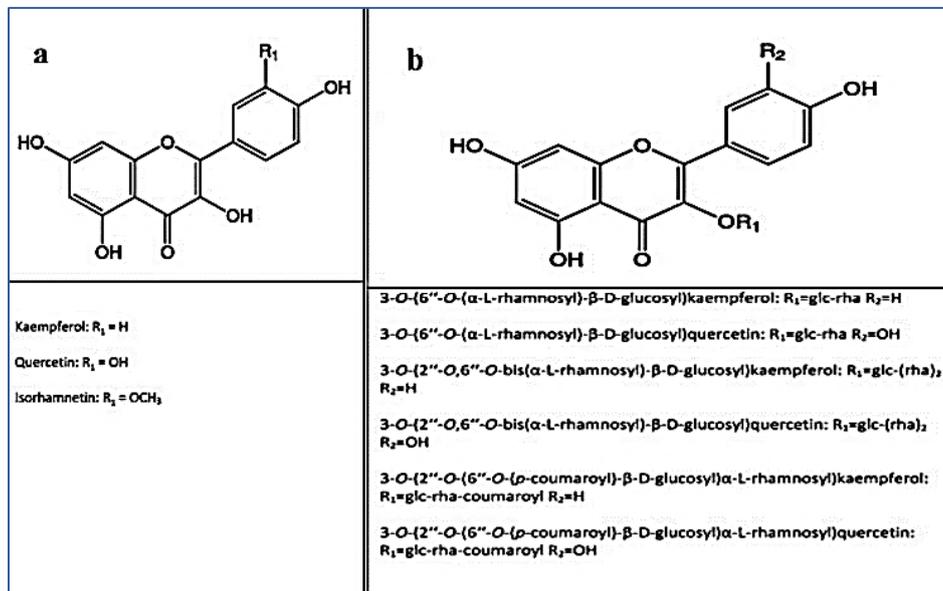


Figure 4 : Structure chimique du flavonoïde (Singh *et al.*, 2008)

La quantité d'acides ginkgoliques (fig. 5) dans l'EGb doit être inférieure à 5 ppm. Il est incontestable aujourd'hui que les composés pharmacologiquement actifs du EGb sont le TTL et les flavonoïdes (Abdel-Kader *et al.*, 2007 ; Ramassamy *et al.*, 2007).

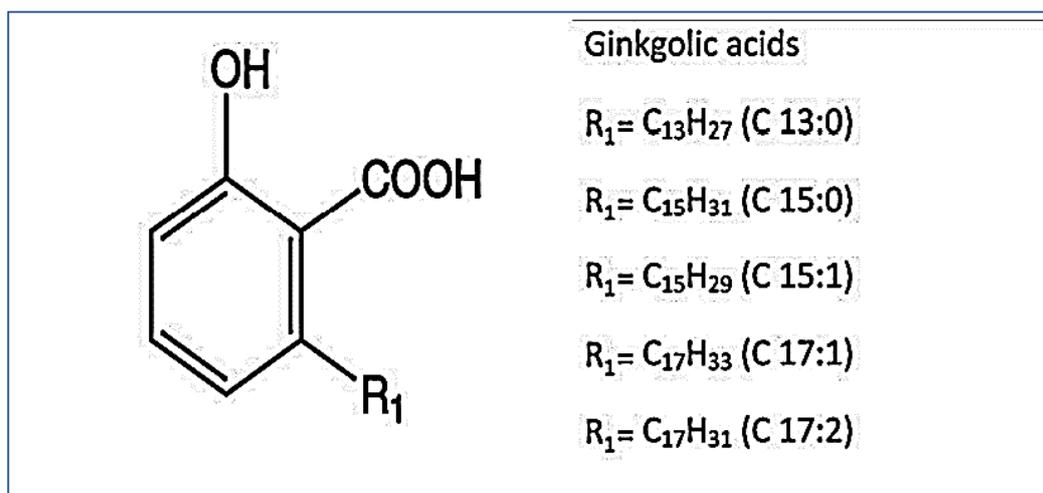


Figure 5 : Structure chimique de l'Acide ginkgolique (Singh *et al.*, 2008)

II.1/ Terpène Trilactones

La classe de composés Terpène Trilactones (TTL) est très rare dans le royaume des plantes ; il n'a été trouvé qu'à *Ginkgo biloba* jusqu'à présent. Les ginkgolides, qui sont des diterpènes C₂₀, sont constitués de six anneaux à cinq chaînons, c'est-à-dire un anneau carbocyclique spiro [4,4] nonane, trois lactones et un tétrahydrofurane, alors que le Bb est un sesquiterpène. Ce sont les seuls produits naturels connus possédant un groupe tert-butyle.

Il a été démontré que EGb 761 protège les mitochondries contre les dommages liés à l'âge et améliore la fonction mitochondriale et le métabolisme énergétique ; cette action est principalement due aux ginkgolides et Bb. Bb permet aux mitochondries de maintenir leur activité respiratoire dans des conditions ischémiques, ce qui retarde le début des dommages induits par l'ischémie. De plus, Bb a un effet protecteur sur la teneur en ATP cellulaire. (Christian *et al.*, 2013).

II.2/ Flavonoïde

Les flavonols sont une grande famille de composés polyphénoliques présents partout dans le royaume végétal et sont donc pris par les humains et les animaux avec leur régime alimentaire régulier. (Van Beek et Montoro, 2009). Plus de 30 flavonoïdes authentiques sont connus dans *Ginkgo biloba*. La diversité des différents flavonoïdes ne résulte pas de la variabilité du cadre de 2-phénylchromane, mais des différents glycosides trouvés dans *Ginkgo biloba*. La portion sucrière se compose de glucosepties et/ou de rhamnose dans divers mono, di- ou triglycosides avec différents modèles de liaison (Singh *et al.*, 2008) (fig. 4).

Certaines données épidémiologiques suggèrent un effet préventif sur les maladies cardiovasculaires par une forte consommation de flavonoïdes (Hertog, Feskens et Kromhout, 1997 ; Yochum *et al.*, 1999). De plus, les glycosides flavonoïdes sont également considérés comme efficaces dans le traitement de l'insuffisance veineuse chronique (Wurglics et Schubert-Zsilavec, 2006).

Dans les études précliniques, les flavonoïdes semblaient être de puissants antioxydants et des récupérateurs radicaux menant à une diminution des niveaux de tissus des espèces réactives d'oxygène (ROS) et l'inhibition de l'oxydation des lipides membranaires. De plus, les flavonoïdes chélatent les ions métalliques de transition pro-oxydants et modifient l'expression des antioxydants. (Wurglics et Schubert-Zsilavec, 2006).

II.3/ Acide ginkgolique

Les acides ginkgoliques sont un mélange de composés d'acide phénolique n-alkyles structurellement apparentés de *Ginkgo biloba* (fig. 5). Ce sont de forts allergènes qui peuvent causer des réactions allergiques sévères. En plus de leurs propriétés allergiques, ils possèdent des propriétés cytotoxiques, mutagènes, cancérogènes et génotoxiques possibles (Liu, Zeng, 2009).

La quantité d'acides ginkgoliques dans le EGb doit être inférieure à 5 ppm en raison des effets secondaires décrits (Ahlemeyer *et al.*, 2001 ; Hecker *et al.*, 2002).

II.4/ Ginkgotoxines

Les ginkgotoxines (fig.6) sont responsables d'effets secondaires tels que les crises d'épileptiformes, l'inconscience et la paralysie des jambes (Leistner et Dreweke, 2009).

Il faut néanmoins garder à l'esprit que les ginkgotoxines se trouvent principalement dans les graines de *Ginkgo biloba* et non dans les feuilles qui sont utilisées pour la production d'EGb. Les données publiées indiquent qu'aucun effet toxique n'est attendu après l'application de l'EGb dans la dose recommandée. (Hecker *et al.*, 2002).

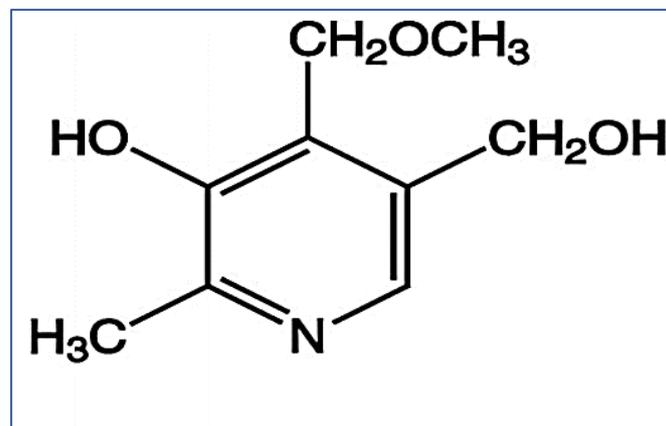


Figure 6 : Structure chimique de Ginkgotoxine (Leistner et Dreweke, 2009)

III/ Effets pharmacologiques du Ginkgo biloba

L'extrait de feuilles de *Ginkgo* a montré des effets bénéfiques dans le traitement des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires, le cancer,

le stress, la perte de mémoire, les tinnites, les plaintes gériatriques comme le vertige, la dégénérescence maculaire liée à l'âge et les troubles psychiatriques comme la schizophrénie. **(Ramassamy, Lomgpre et Christen, 2007).**

L'effet le plus important c'est l'effet antioxydant.

Les deux mécanismes d'action proposés sont :

1. la récupération directe des radicaux libres
2. l'inhibition indirecte de la formation de radicaux libres.

L'extrait de la feuille de *Ginkgo* peut dévaster des espèces réactives d'oxygène (ROS) comme les radicaux hydroxyles (OH), le radical peroxy (ROO), le radical d'anion superoxyde (O₂⁻), le radical d'oxyde nitrique (NO), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les espèces d'ions ferrylés. **(Mahady, 2002 ; DeFeudis et al., 2003).**

L'extrait de la feuille de *Ginkgo* peut également améliorer les activités des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase, la catalase et/ou l'hémisphère-oxygénase-1, contribuant ainsi indirectement à la formation d'un antioxydant. **(Song et al., 2000 ; DeFeudis et al., 2003).**

Il a été suggéré que l'extrait de feuilles de *Ginkgo* augmente l'expression des enzymes mitochondriales comme les déshydrogénases NADH, qui peuvent influencer la génération de ROS dans les mitochondries. Il s'agit d'une protection contre le découplage de la phosphorylation oxydative, augmentant ainsi les niveaux d'ATP régulant le métabolisme énergétique. **(Janssens et al, 1995 ; Tendi et al, 2002).**

Les principaux constituants impliqués dans toutes ces actions sont les flavonoïdes (quercétine et kaempferol) et les terpénoïdes (ginkgolides et bilobalide) **(Bastianetto et al., 2000 ; DeFeudis et al, 2003 ; Smith et Luo, 2004)** où chacun contribue différemment à sa propriété antioxydante. On sait que les flavonoïdes exercent leurs effets par inhibition de l'enzyme cyclooxygénase-2, qui fait partie de la synthèse de la prostaglandine, et que son inhibition est connue pour réduire la cancérogénèse du côlon. Les bilobalides augmentent les activités des enzymes antioxydantes (SOD et catalase) et améliorent la viabilité cellulaire. **(DeFeudis et al., 2003).**

Chapitre 03 :

Foie

I/ Organisation du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain. Il est situé dans la partie supérieure droite de la cavité abdominale. Classiquement le foie est divisé en quatre lobes, chacun étant subdivisé en un ou plusieurs segments. (Bismuth, 2013)

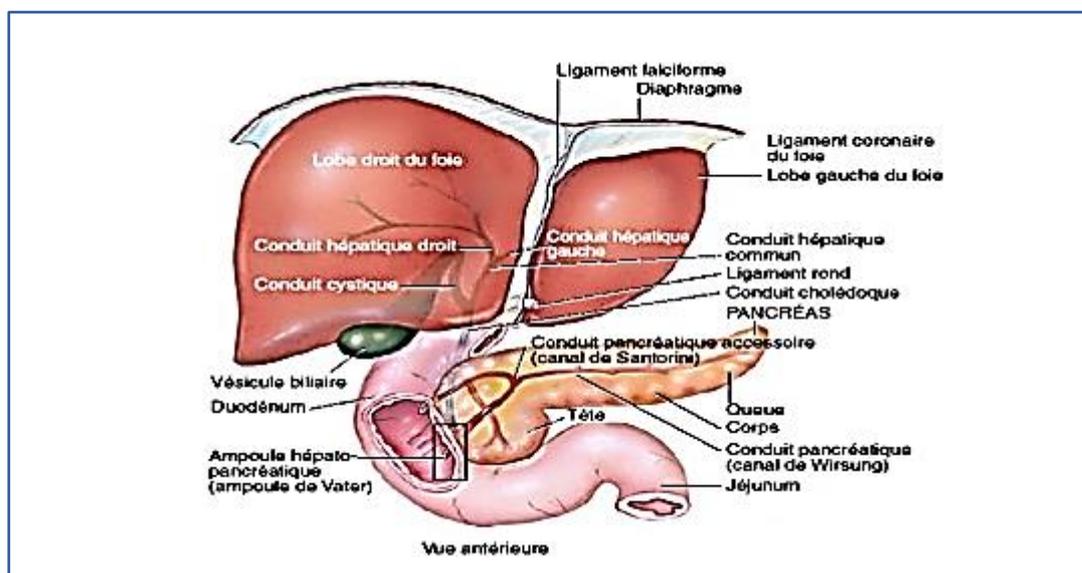


Figure 7 : Organisation structurale et anatomique du foie (Marchall et Bangert, 2004)

Chaque lobe entoure une veine centrale qui permet la sortie du sang. Ils sont généralement de forme hexagonale où chaque sommet est composé de la triade portale (Figure 2). Comme son nom l'indique, celle-ci est composée de trois conduits, soit une branche issue de la veine porte qui apporte le sang non oxygéné à la triade, une artériole hépatique qui transporte le sang oxygéné et un canal biliaire (Gordillo *et al.*, 2015).

Les hépatocytes sont localisés dans trois régions distinctes. La première, la zone périportale, se situe à l'entrée du sang près de la veine porte et de l'artère hépatique et est suivie de la zone intermédiaire. Finalement, on retrouve la zone péricentrale qui se situe à proximité de la veine centrale qui permet la sortie du sang (Gordillo *et al.*, 2015 ; Rosenberg *et al.*, 1996). Il est intéressant de noter que la concentration en oxygène diminue au cours de l'avancement vers la veine centrale. (Kietzmann, 2017).

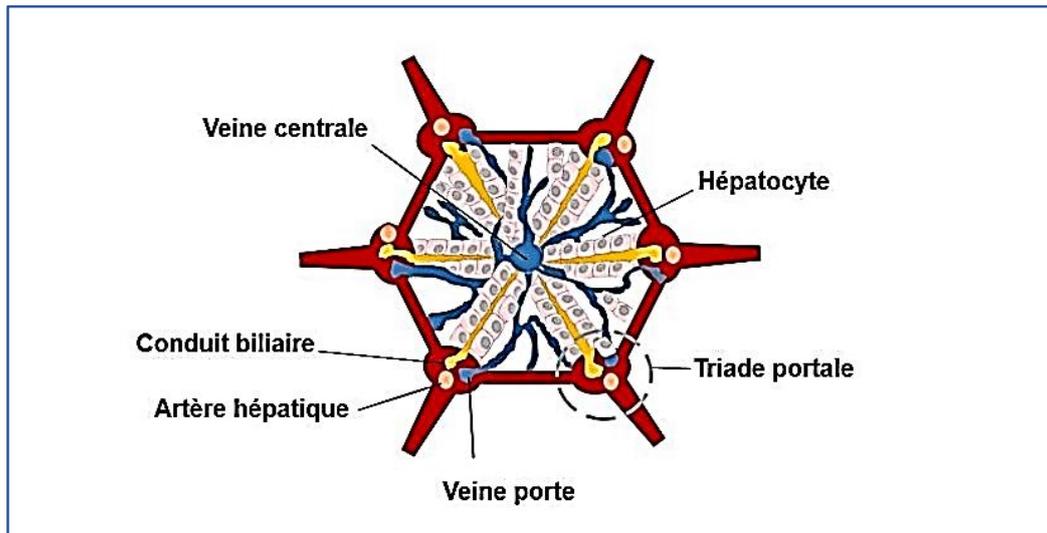


Figure 8 : Vue de haut d'un lobule hépatique. (Gordillo M *et al.*, 2015)

Le foie est composé de différents types cellulaires : les hépatocytes (60 à 65% des cellules hépatiques), les cellules endothéliales sinusoidales (15 à 20 %), les cellules de Kupffer (8 à 12 %), les cellules stellaires ou de Ito (3 à 8 %), les cholangiocytes (cellules épithéliales constituant le canal biliaire, 3 à 5%) et les cellules dendritiques hépatiques (moins de 1 %) (Figure 3) (Nakai H, 2011).

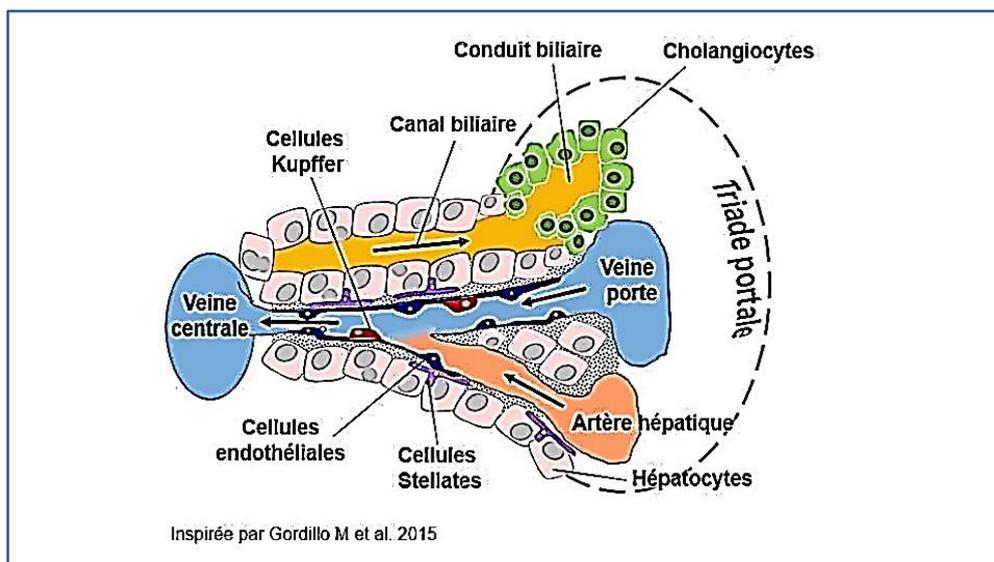


Figure 9 : Différents types cellulaires composants un lobule de foie. (Gordillo M *et al.* 2015)

II/ Fonctions du foie

Le foie est la plus grosse glande du corps humain (**Gordillo et al., 2015**). Le foie, est une glande amphicrine, c'est-à-dire qu'il exerce des fonctions endocrines et exocrines. La fonction endocrine du foie permet la libération de diverses hormones dont le facteur de croissance à l'insuline, la thrombopoïétine et l'angiotensinogène directement dans le sang (**Si-Tayeb et al., 2010**). La fonction exocrine permet la sécrétion de diverses substances à l'extérieur du corps, telles que la sécrétion de bile dans le tube digestif qui est nécessaire à la digestion des gras et à l'absorption de certaines vitamines. Le foie est aussi impliqué dans de nombreuses fonctions métaboliques cruciales incluant le métabolisme des nutriments ingérés par notre alimentation, la régulation du cholestérol, le stockage du glycogène, la détoxification des drogues, le métabolisme de l'urée, ainsi que la sécrétion de protéines plasmatiques comme l'albumine (**Si-Tayeb et al., 2010**). Le métabolisme des médicaments et la détoxification des drogues sont des processus également très importants. Le foie agit comme un filtre pour le sang en récupérant les substances toxiques et en les convertissant en substance moins toxique, ce qui facilite leur élimination par l'organisme (**Grant, 1991 ; Si-Tayeb et al., 2010**). Tous ces rôles sont primordiaux pour le maintien de l'homéostasie du corps et doivent de ce fait être hautement régulés (**Si-Tayeb et al. 2010**).

II.1/ Fonction de détoxification

Le foie est l'organe central de détoxification permettant à l'organisme d'éliminer des substances endogènes ou exogènes (dites xénobiotiques). Alors que les substances hydrosolubles peuvent être directement éliminées par les reins, les substances lipophiles doivent au préalable être transformées par le foie.

Classiquement ce processus de transformation est divisé en trois grandes phases et a lieu au niveau des hépatocytes : la phase I permet l'hydroxylation du composé à éliminer, la phase II la conjugaison de ce dernier avec une protéine. Ces deux étapes permettent de transformer le composé souvent très hydrophobe en une molécule hydrosoluble plus facile à éliminer. La phase III consiste en l'excrétion active de ce dernier, à l'aide de transporteurs transmembranaires, soit dans le flux sanguin afin d'être éliminé au niveau rénal, soit dans la bile pour être éliminé *via* les fèces, après sécrétion de la bile au niveau de l'intestin (**Modica et al., 2009 ; Sendensky et Dufour, 2011**).

Notre corps est exposé à diverses substances potentiellement toxiques de différentes façons (alimentation, contact cutané, respiration). Ces expositions résultent souvent en la présence de ces substances dans le sang qui sera acheminé vers le foie. Ainsi, on peut dire que les cellules du foie sont les plus exposées à toutes substances potentiellement toxiques auxquelles notre corps a été en contact. C'est également l'un des premiers organes à être exposé aux vitamines, métaux, drogues, bactéries et substances environnementales toxiques contenues dans le sang. En effet, le sang veineux à proximité de l'intestin et de l'estomac récupère ces substances afin de les acheminer directement vers la veine porte du foie. Dans le foie, ces substances sont traitées puis entreposées, détoxifiées ou modifiées et retourneront soit dans la circulation sanguine systémique par la veine centrale ou bien elles seront relâchées dans la bile afin d'être éliminées). La destruction d'une grande population d'hépatocytes peut fortement affecter les fonctions hépatiques et aller jusqu'au dérèglement de l'organe. La perte de fonction peut également survenir lorsqu'une atteinte de type chronique favorise la formation d'un tissu cicatriciel non fonctionnel médié par la transformation des cellules Stellaires (**Modica et al., 2009**).

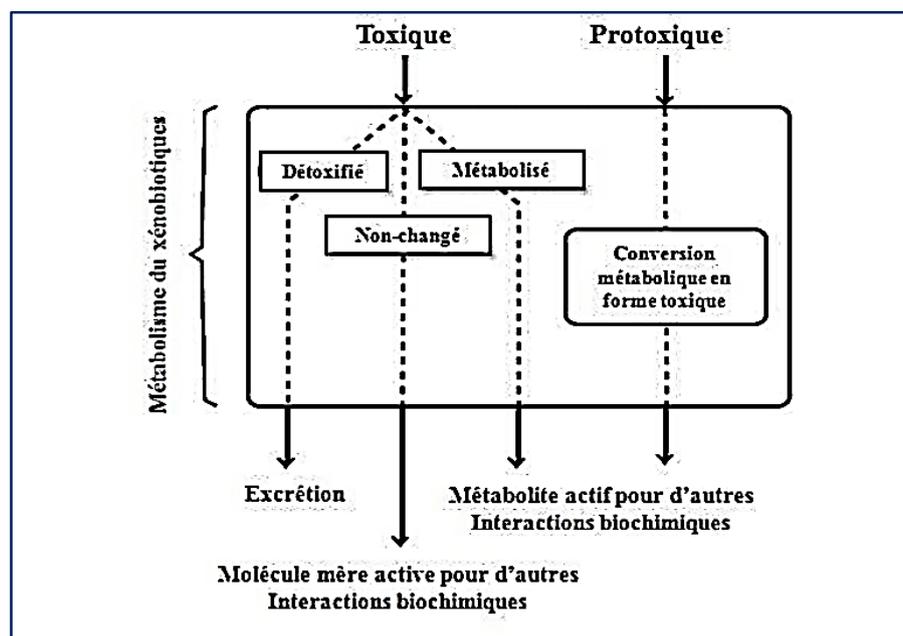


Figure 10 : Interactions biochimiques des xénobiotiques (**Manahan, 2003**).

II.2/ Fonction du stockage et de production

Le foie stocke de nombreux composés, par exemple le fer ou des vitamines. Les composés stockés par le foie sont ensuite libérés dans la circulation selon les besoins de l'organisme. Le foie est également un organe où a lieu la synthèse d'un grand nombre de protéines utiles à l'ensemble de l'organisme. Ainsi, la majorité des protéines circulant au niveau sanguin est produite et sécrétée par le foie : il s'agit notamment des différentes protéines plasmatiques telles que l'albumine, la transferrine, les lipoprotéines mais aussi des protéines reliées au système immunitaire telles que le complément, ainsi que la plupart des facteurs impliqués dans la régulation de la coagulation (**Sendensky et Dufour JF, 2011**).

III/ Evolution de la fonction hépatique

Pour évaluer l'état du foie, un examen approfondi doit être mis en place, il comporte des tests biochimiques (enzymatiques et protéines plasmatiques) et histologiques (**Rajender et Faust, 2006**).

Les enzymes utilisées dans l'évaluation de la fonction hépatique sont l'aspartate et l'alanine aminotransférases (TGO et TGP), la phosphatase alcaline PAL et γ glutamyl transférase (γ GT). En général, ces enzymes ne constituent pas des marqueurs spécifiques du dysfonctionnement hépatique. L'isoenzyme hépatique des PAL est une exception, et l'activité TGP est plus spécifique du foie que TGO (c'est l'enzyme de l'exploration musculaire et se trouve également dans les muscles striés). L'augmentation des aminotransférases conduit une cytolyse, les activités plasmatiques peuvent être 20 fois plus élevées que la limite supérieure de la normale en cas d'hépatite. Dans le syndrome de cholestase l'activité de PAL s'élève, cela est dû principalement à l'augmentation de la synthèse de l'enzyme stimulée. Cependant, en pratique, l'augmentation de l'activité des aminotransférases et PAL est fréquente dans les Pathologies hépatiques en général. (**Marchall et Bangert, 2004**).

Matériel et Méthodes

I/ Matériel biologique

Notre étude a été réalisée sur 24 lapins de la race *néo-zélandais* de sexes mâle et femelle. Ils nous ont été fournis par un éleveur de lapins (wilaya de Tébessa). Les lapins avaient un poids initial variant entre 1,97 et 3,1 kg.



Figure 11 : Lapin de race *néo-zélandais*.

II/ Produits administrés

Pour réaliser notre travail, nous avons utilisé deux produits distincts :

- ❖ le Nitrite de Sodium NaNO_2 sous forme de sel
- ❖ Le Tanakan (extrait de *Ginkgo biloba* standardisé (EGb 761) titré à 24% des hétérosides de ginkgo et 6% de ginkgolides-bilobalides)

II.1/ Nitrite de sodium NaNO_2

Le nitrite de sodium se présente sous la forme d'une poudre blanche ou légèrement jaunâtre, hygroscopique, inodore, à saveur salée.

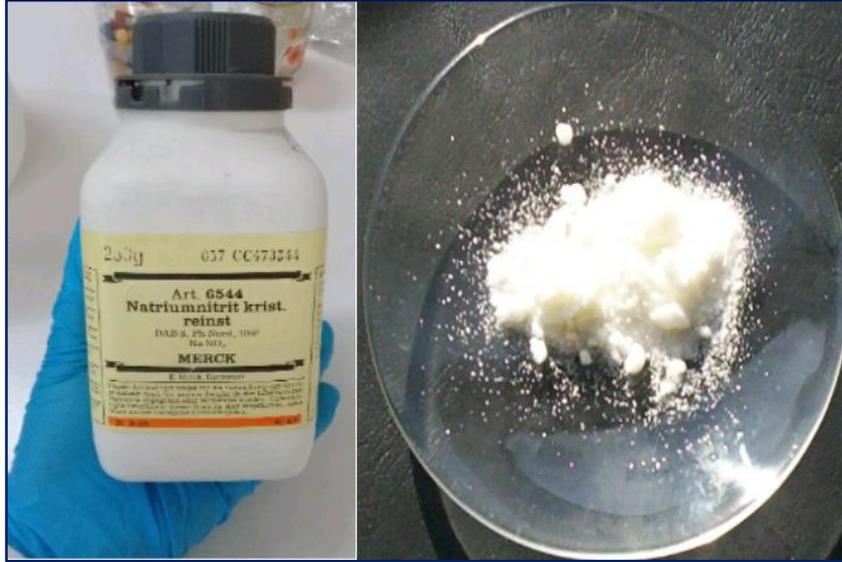


Figure 12 : Nitrite de Sodium

. II.2/ Tanakan

Le Tanakan est un extrait de *Ginkgo biloba* standardisé (EGb 761) titré à 24% des hétérosides de ginkgo et 6% de ginkgolides-bilobalides. Les feuilles de *Ginkgo biloba* contiennent des stérols, des alcools et des cétones aliphatiques. Elles contiennent également deux groupes très importants :

- ❖ Des hétérosides flavonoïdes.
- ❖ Des terpènes spécifiques (ginkgolides A, B et C et bilobalide).

Chaque 1 ml de solution contient 40 mg d'extrait sec de feuilles de *Ginkgo biloba* L. (35-67:1) composé de :

- ❖ 8,8 à 10,6 mg de flavonoïdes exprimés en glycosides de flavone
- ❖ 1,1 à 1,4 mg de ginkgolides A, B, C
- ❖ 1,0 à 1,3 mg de bilobalide. (Allard. Med., 1986)

III/ Méthode d'élevage et du traitement

III.1/ Elevage

L'élevage des lapins a été réalisé dans la serre 2 du département de Biologie appliquée de la faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie de TEBESSA.

Les lapins ont été maintenus dans des cages métalliques contiennent toutes les informations nécessaires concernant l'animal durant toute la période de l'adaptation et celle du traitement.

Les animaux ont un accès libre à la nourriture (aliments granulés pour lapins **SARL** la production locale **CEREGAN**) et à l'eau.



Figure 13 : Nourriture utilisée dans l'élevage

Des mesures de poids corporel ont été prises au début de l'expérience et après chaque semaine durant tout le traitement. Des analyses biochimiques du sang ont été effectuées afin de suivre l'état de santé des lapins et cela chaque semaine après arrêt de l'administration des nitrites.

III.2/ Traitement

Après la période d'adaptation (30 jours), les lapins ont été répartis en 4 lots. Le traitement a été appliqué par gavage de l'animale avec des gélules contenant du nitrite de sodium (100mg/kg du poids corporel) et/ou du Tanakan (20mg/kg du poids corporel) durant 9 semaines.

Lot 1 : Témoin sain qui n'a reçu aucun traitement

Lot 2 : les lapins ont été gavés avec des gélules contenant 100 mg/Kg de NaNO₂ pendant 6 semaines consécutives, puis arrêt du traitement. Et, nous avons mis les lapins sous observation pendant les trois semaines suivantes sans aucun traitement.

Après chaque semaine 3 lapins sont sacrifiés :

- ❖ N1 : Lot de lapins traités avec NaNO₂ seul pendant 6 semaines et sacrifié après une semaine d'arrêt du traitement
- ❖ N2 : Lot de lapins traités avec NaNO₂ seul pendant 6 semaines et sacrifié après deux semaines d'arrêt du traitement
- ❖ N3 : Lot de lapins traités avec NaNO₂ seul pendant 6 semaines et sacrifié après trois semaines d'arrêt du traitement

Lot 3 : les lapins ont été traités comme le lot 2 pendant 6 semaines puis après arrêt de l'administration du NaNO₂, les lapins ont été traités avec le Tanakan à 20 mg/Kg pendant les 3 semaines suivantes

- ❖ NT1 : Lot de lapins traité avec le NaNO₂ seule pendant 6 semaines et une semaine du Tanakan seul.
- ❖ NT2 : Lot de lapins traité avec le NaNO₂ seule pendant 6 semaines et deux semaines du Tanakan seul.
- ❖ NT3 : Lot de lapins traité avec le NaNO₂ seule pendant 6 semaines et trois semaines du Tanakan seul.

Lot 4 : les lapins ont reçu pendant trois semaines du Tanakan seul à 20 mg/Kg. (**voir annexe**).

III.3 Prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins sont effectués au niveau de la veine marginale de l'oreille des lapins à l'aide d'aiguille en général d'un diamètre de 18 à 20 gauges.

Le sang est immédiatement recueilli dans des tubes étiquetés (tubes héparines) serviront pour les paramètres biochimiques (TGO. TGP. PAL. GGT. Bilirubine T/D. Albumine).

Les analyses biochimiques des lapins étaient effectuées dans une pharmacie privée - TEBESSA -.

IV/ Analyse des marqueurs de la fonction hépatique

IV.1/ Dosages des transaminases

Le taux des transaminases est déterminé par une cinétique enzymatique colorimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre par un kit de SPINREACT spécifique pour chaque paramètre.

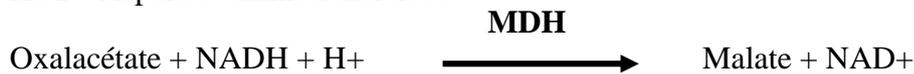
❖ Transaminase Glutamo-oxalo-acétique (TGO)

➤ Principe

Aspartate aminotransférase (AST) ou Transaminase Glutamo-oxalo-acétique (TGO) catalyse la réaction suivante :



AST : Aspartate aminotransférase



MDH : Malate déshydrogénase

Le taux de diminution de la concentration de NADH, Mesuré photométriquement, est proportionnel à la concentration de catalyseur d'AST présente dans l'échantillon (**voir annexe**).

❖ Transaminase glutamopyruvique (TGP)

➤ Principe

Alanine aminotransférase (ALT) ou Transaminase glutamopyruvique (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'alanine à l'acide α -cétoglutarique ont formant l'acide glutamique et l'acide pyruvique.

L'acide pyruvique produit est réduit en acide lactique par lactate déshydrogénase (LDH) et NADH :



Le taux de diminution de la concentration de NADH, mesuré photométriquement, est proportionnel à la concentration de catalyseur d'ALT présente dans l'échantillon (**voir annexe**).

IV.2/ Dosage d'Alcaline phosphatase (ALP)

➤ Principe

L'Alcaline phosphatase (ALP) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophenyl phosphate au pH 10.4, libérant p-nitrophenol et phosphate, selon la réaction suivante :

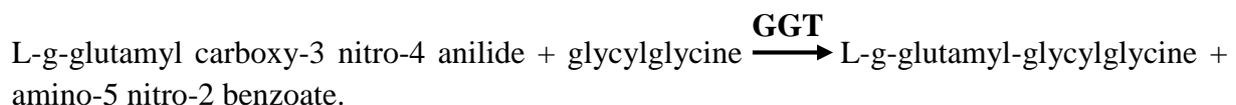


Le taux de la formation de p-Nitrophenol, mesuré photométriquement, est proportionnel à la concentration catalyseur de l'Alcaline phosphatase présente dans le sérum (**voir annexe**)

IV.3/ Dosage de G-glutamyl transférase (GGT)

➤ Principe

La G-glutamyl transférase est une peptidase qui hydrolyse l'acide glutamique fixé au N-terminal des protéines ou des peptides par son groupement gamma carboxyle, et le reconjuge à un accepteur approprié (peptides, eau, acides aminés L).



La vitesse de libération du 5-amino-2-nitrobenzoate coloré en jaune est directement proportionnelle à l'activité de la GGT dans l'échantillon et se mesure avec l'augmentation de l'absorbance à 409 nm. (**Voir annexe**).

IV.4/ Dosage d'Albumine

➤ Principe

L'albumine est la protéine la plus abondante (60 %) du sérum humain, En plus d'être produite par le foie, l'albumine est apportée au corps par l'alimentation.

Le dosage de l'albumine est réalisé par la méthode spectrophotométrique au vert de bromocrésol.

Matériel et réactifs

- ✓ Sérum à doser (environ 0,1 ml) Solution étalon d'albumine à 60 g/L (10 ml)
- ✓ Sérum de contrôle à 40 g d'albumine / L (environ 0,1 ml)

- ✓ Réactif de coloration : vert de bromocrésol en tampon pH 4,2 (environ 20 ml) (**Voir annexe**).

IV.5/ Dosage de Bilirubine totale

La concentration de bilirubine totale est déterminée à l'aide de surfactants qui solubilisent la bilirubine non conjuguée (bilirubine indirecte) et dénaturant l'albumine, son transporteur.

Les bilirubines conjuguées et non conjuguées de l'échantillon réagissent avec l'acide sulfanilique diazoté pour former l'azobilirubine coloré en rouge.

Aide sulfanilique + NaNO₂ \longrightarrow acide sulfanilique diazoté

Bilirubine + acide sulfanilique diazoté \longrightarrow azobilirubine.

Le maximum d'absorbance de l'azobilirubine étant pH dépendant, on utilise un système tampon acide oxalique/acide sulfanilique pour maintenir le pH de la réaction.

L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de bilirubine totale dans l'échantillon et est déterminée par mesure de l'augmentation de l'absorbance à 552 nm. (**Voir annexe**).

IV.6/ Dosage de Bilirubine directe

La bilirubine conjuguée et la bilirubine directe réagissent directement avec l'acide sulfanilique diazoté dans un tampon acide pour former l'azobilirubine colorée en rouge.

Bilirubine + acide sulfanilique diazoté \longrightarrow azobilirubine

Le maximum d'absorbance de l'azobilirubine étant pH dépendant, on utilise un système tampon d'acide oxalique/acide sulfanilique pour maintenir le pH de la réaction. (**Voir annexe**).

V/ Analyse statistique

La saisie des données a été réalisée à l'aide de logiciel Excel 2013, nous avons appliqué une analyse de variance ANOVA I avec une valeur $\alpha = 0.05$ pour comparer la réponse des différents lots à nos traitements en utilisant Minitab version 15.

Résultats

I/ Poids corporel

Le suivi du poids corporel des lapins témoins et traités par le nitrite de sodium a été réalisé de manière hebdomadaire au début de chaque semaine pendant 9 semaines.

Le profil de croissance des lapins témoins était stable montrant une augmentation régulière dans le poids des animaux jusqu'au jour du sacrifice. Les lapins traités par le nitrite de sodium seul ont présenté également une évolution normale en fonction du temps sauf qu'une légère diminution de poids à la deuxième semaine de traitement a été remarquée puis une reprise de poids normale a été observée.

De même, les lapins témoins pour le Tanakan (pris seul pendant trois semaines) où ceux traités par le Tanakan après arrêt de la prise du nitrite de sodium ont montré une croissance similaire à celle de ceux traités par le nitrite de sodium seul et à celle des témoins.

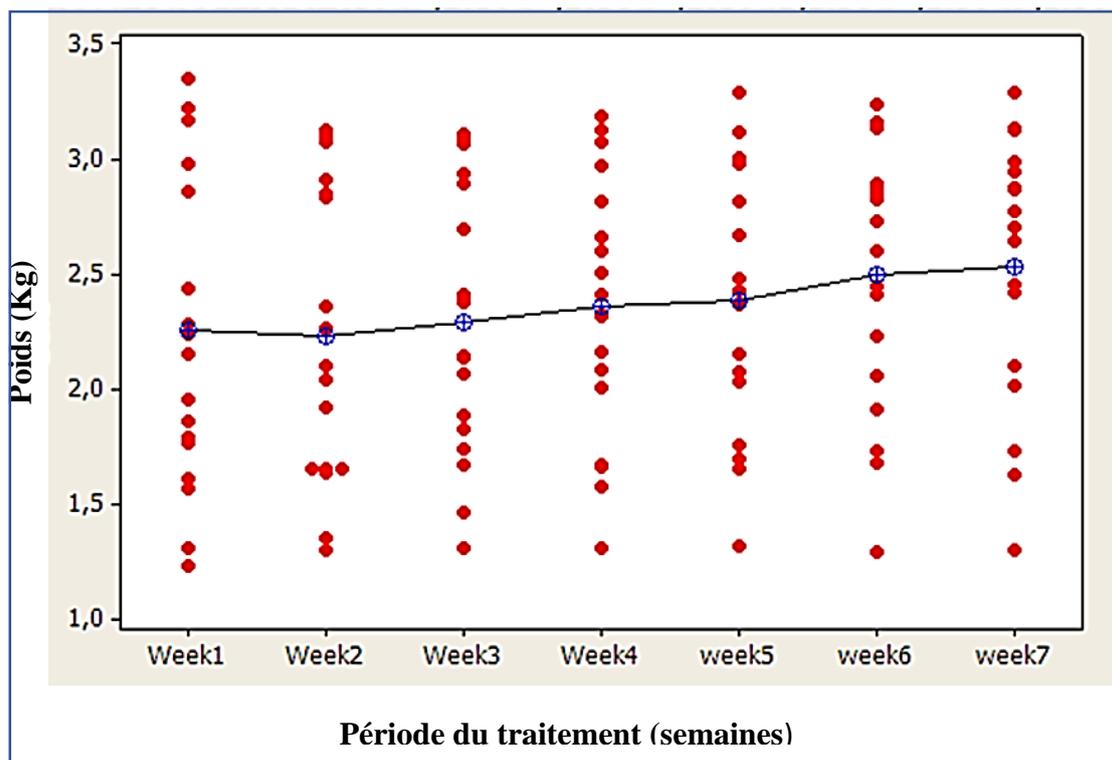


Figure14 : Variation des poids des lapins pendant la période du traitement

Ces résultats signifieraient que l'administration du nitrite de sodium par voie orale à la concentration de 100 mg/kg ainsi que celle du Tanakan à 20 mg/kg pendant la période expérimentale ne semble perturber la croissance physiologique des lapins

II/ Rapport hépato-somatique

Le rapport hépato-somatique (RHS) est défini comme étant le rapport entre le poids du foie et le poids corporel du lapin, en pourcentage.

$$RHS = Pf/Pi * 100$$

Avec : Pf : poids du foie en g et Pi : poids du lapin en g

Le rapport hépato-somatique des lapins traités a montré une fluctuation légère en fonction du temps mais qui reste dans l'ensemble statistiquement non significative avec $p = 0,15$ pour le facteur traitement et $p = 0,75$ pour le facteur temps. Ainsi, le foie des lapins traités par le nitrite de sodium seul a présenté un poids inférieur à celui du témoin durant la première semaine après arrêt du traitement qui a ensuite légèrement augmenté puis rechuté. Alors que les lapins traités par le Tanakan après arrêt de la prise du nitrite de sodium ont montré un rapport hépato-somatique plus élevé malgré la baisse de ce rapport durant la deuxième et troisième semaine de traitement.

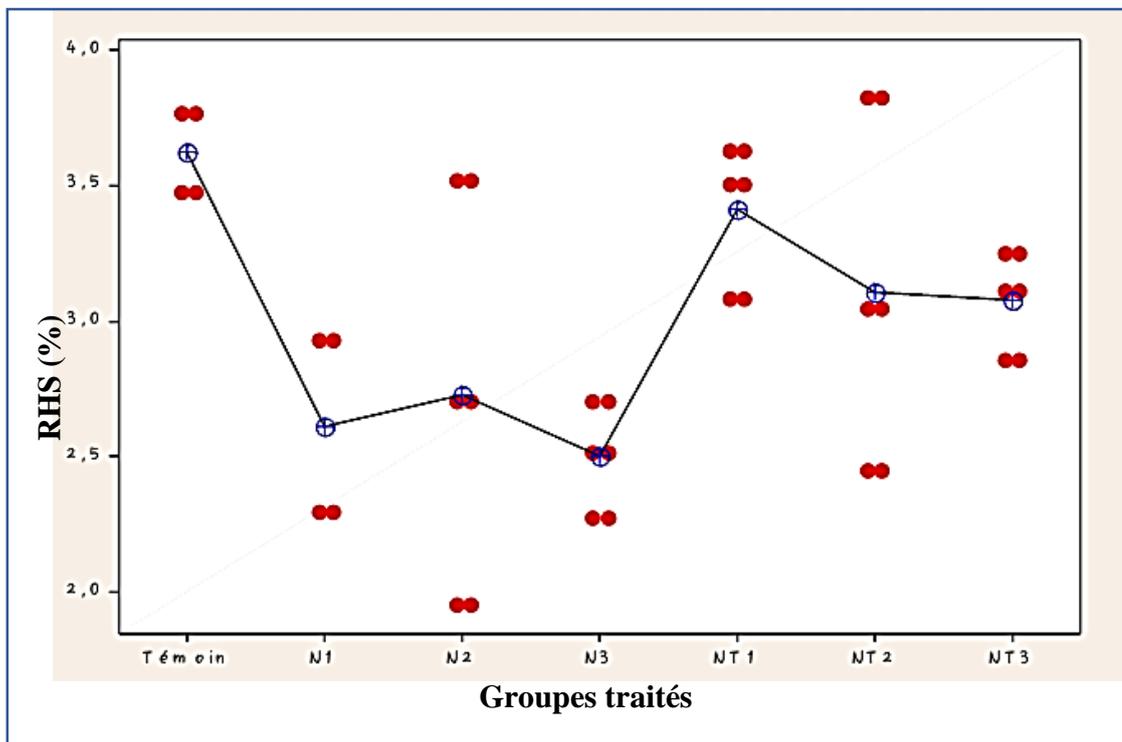


Figure 15 : Variation du rapport hépato somatique pendant la période du traitement

III/ Marqueurs de la fonction hépatique

III.1/ Transaminases

❖ Transaminase Glutamo-oxalo-acétique (TGO)

L'étude des taux de TGO chez les lapins traités avec le nitrite de sodium seul a montré une fluctuation à travers le temps. Ainsi, après la première semaine d'arrêt de la prise du NaNO₂ les concentrations de TGO étaient fortement élevées par rapport aux témoins (p= 0,02), ces taux ont montré une diminution significative après la deuxième semaine (p= 0,012) mais qui reste supérieur à ceux du témoin puis augmentent une deuxième fois (p= 0,049).

Le même profil de variation des taux de TGO a été observé chez les lapins traités par le Tanakan après arrêt de la prise du nitrite de sodium mais les valeurs étaient nettement inférieures avec les taux de la deuxième semaine qui n'étaient pas différentes statistiquement avec celle du témoin (p= 0.833).

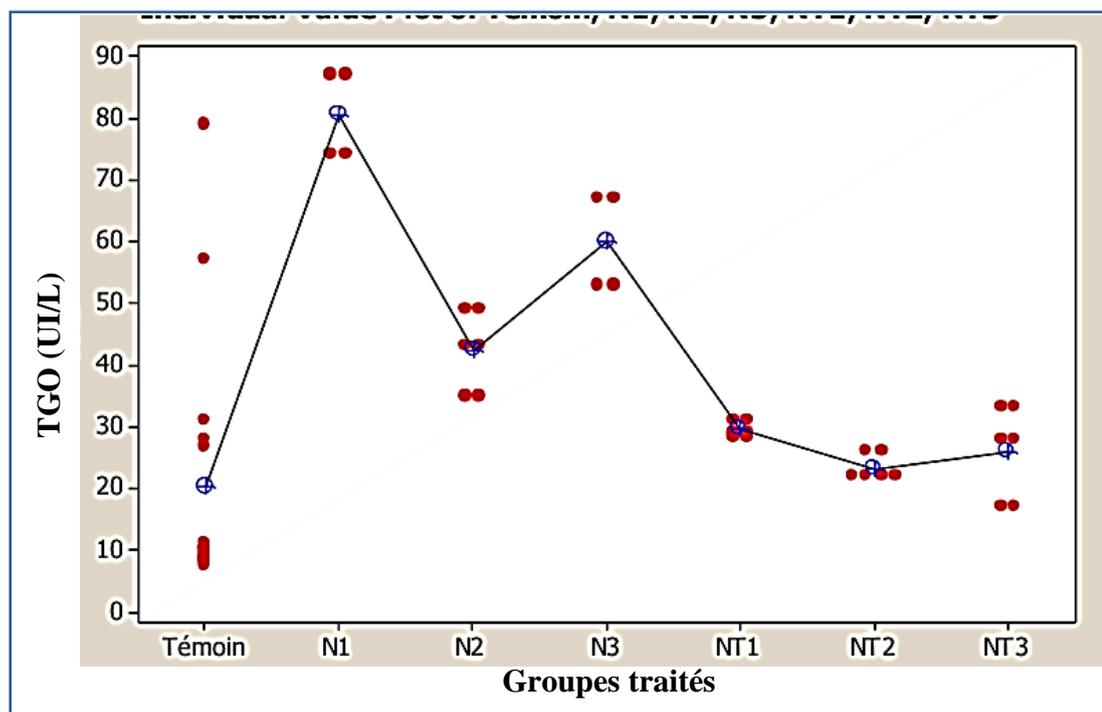


Figure16 : Variation du teneur plasmatique en TGO des lapins témoins et traités pendant la période du traitement

L'administration du Tanakan a montré un effet bénéfique concernant les altérations hépatiques reflétées par la libération excessives de la TGO dans le sang.

❖ **La Transaminase Glutamo- glutamopyruvique (TGP) :**

Les taux de TGP ont montré une nette différence entre les deux lots d'animaux traités avec une évidence de l'effet positif de l'administration du Tanakan sur ce paramètre hépatique.

Ainsi, les lapins traités avec le nitrite de sodium seul ont présenté des taux élevés de TGP par rapport aux témoins ($p= 0,00$) durant les trois semaines après l'arrêt du traitement malgré la diminution statistiquement significative ($p= 0,031$) à la deuxième semaine d'arrêt.

L'administration du Tanakan a montré une légère élévation des taux de TGP par rapport aux témoins ($p= 0,001$) à la première semaine qui diminue à la deuxième semaine pour ne montré aucune différence significative par rapport aux témoins ($p= 0.056$). Les concentrations de TGP observées à la troisième semaine ont présenté une légère tendance à l'augmentation ($p= 0,062$).

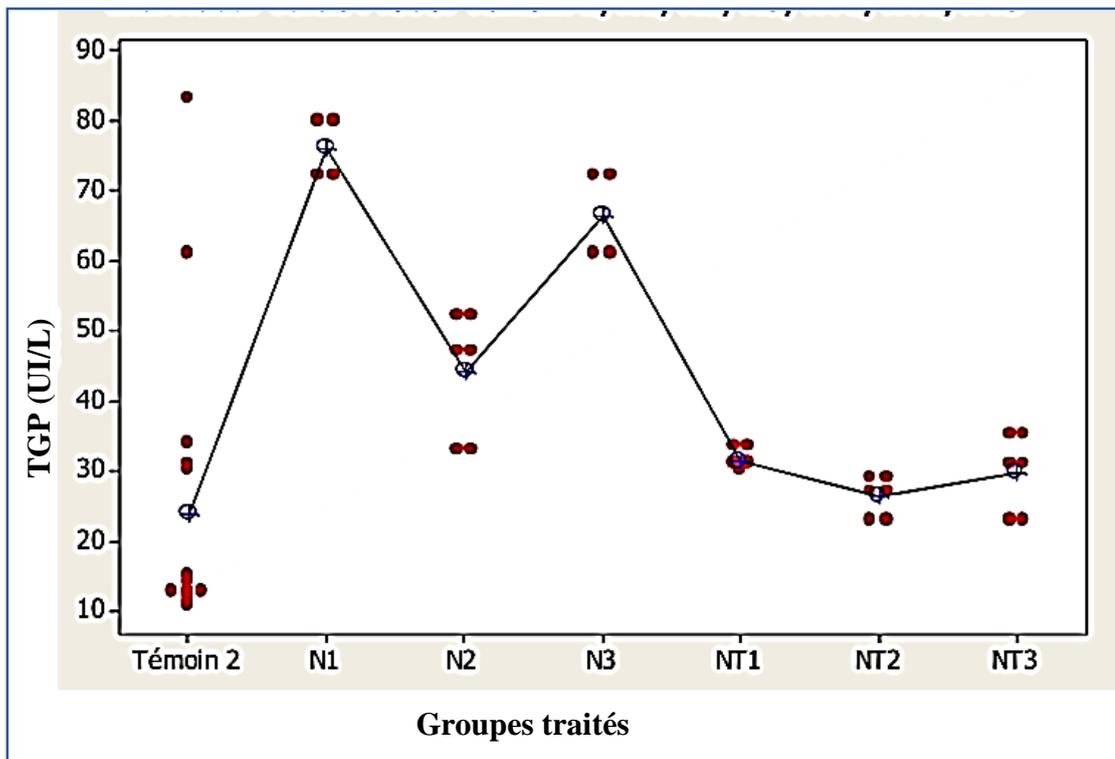


Figure17 : Variation du teneur plasmatique en TGP des lapins témoins et traités pendant la période du traitement

III.2/ Alcaline phosphatase (ALP) :

L'analyse statistiques des résultats des taux de la phosphatase alcaline montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les groupes d'animaux traités ni à travers le temps ($p= 0.10$), ni à travers le traitement ($p= 0,325$). Néanmoins, une légère augmentation des valeurs de

PAL pendant la deuxième semaine a été observée chez le groupe traité avec le nitrite et ceux traités avec le Tanakan qui a diminuée durant la dernière semaine.

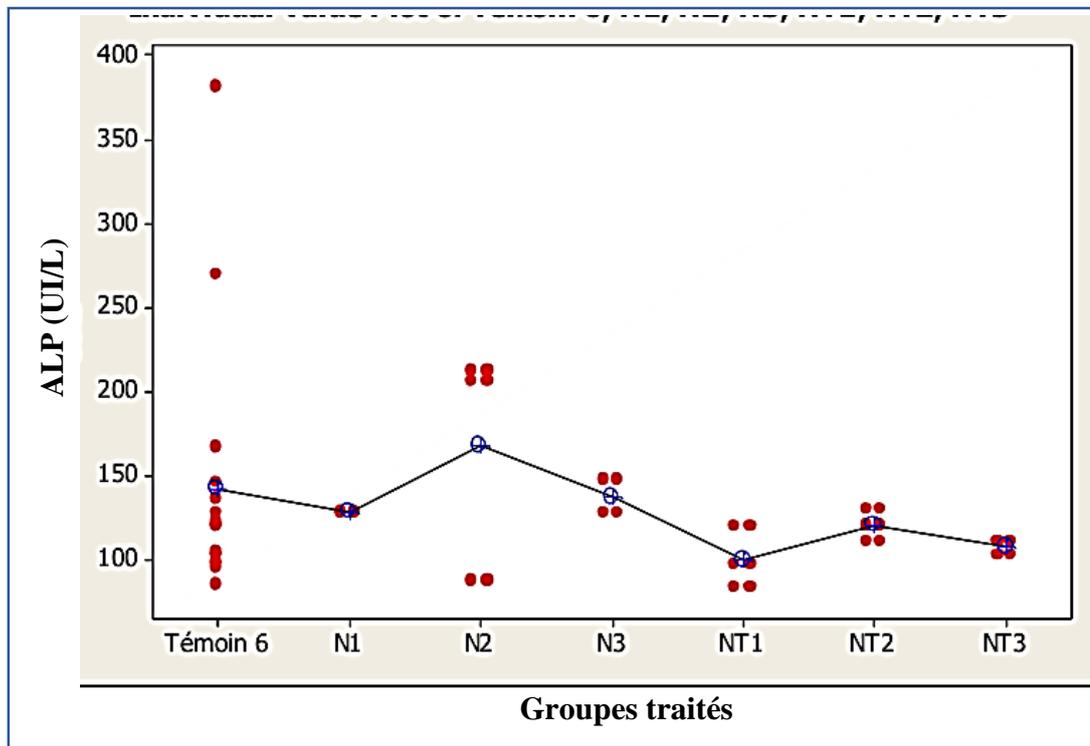


Figure18 : Variation du teneur plasmatique en ALP des lapins témoins et traités pendant la période du traitement

III.3/ G-Glutamyl transférase (GGT) :

Les concentrations en GGT chez les lapins traités avec le nitrite de sodium seul ont montré une hausse après la première semaine d'arrêt de la prise du NaNO_2 par rapport aux témoins ($p=0.254$) puis ces taux sont redevenu normaux durant la suite de l'expérimentation ($p=0.011$) après la 2^{ème} semaine/témoins et ($p=0.204$) après la 3^{ème} semaine / témoins).

Le profil de variation des taux de GGT observé chez les lapins traités par le Tanakan après arrêt de la prise du nitrite de sodium était différent de sorte que les valeurs étaient après la 1^{ère} semaine de traitement non différentes de celles des témoins ($p=0,126$) puis elles ont commencées a augmenté durant la 2^{ème} semaine et ont continuées leur hausse à la 3^{ème} semaine de traitement pour devenir statistiquement différents des témoins ($p=0,007$).

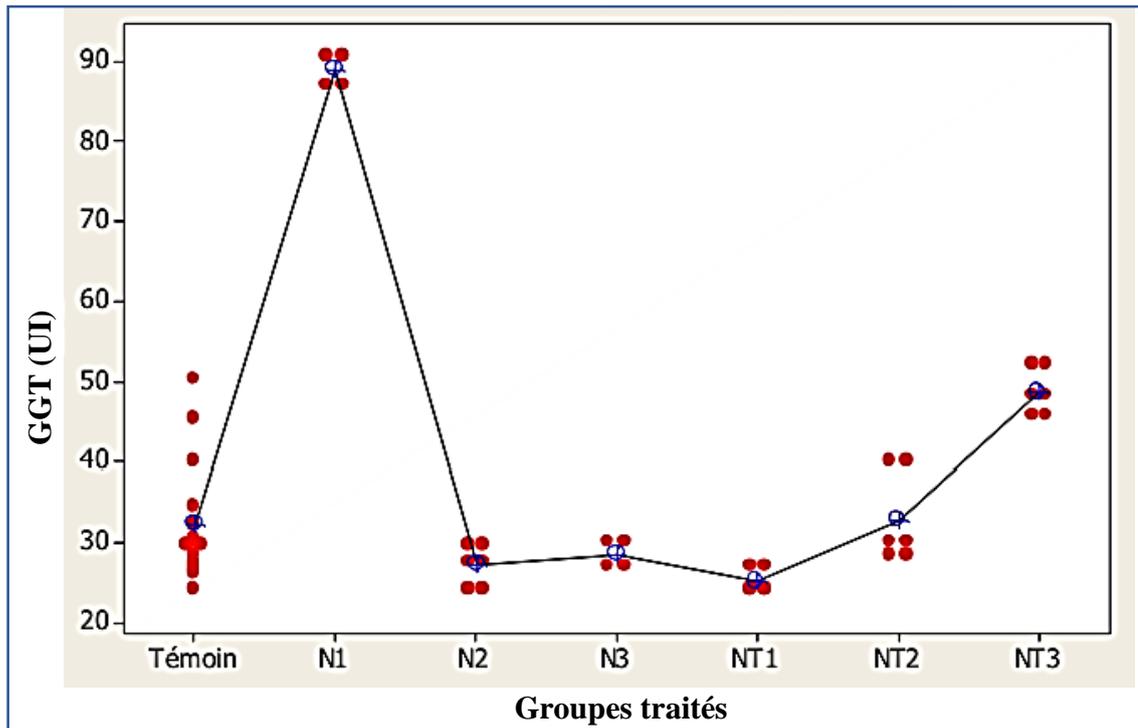


Figure19 : Variation du teneur plasmatique en GGT des lapins témoins et traités pendant la période du traitement

III.4/ Albumine :

L'analyse statistiques des résultats des taux de l'albumine montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les groupes d'animaux traités ni à travers le temps ($p= 0,59$), ni à travers le traitement ($p= 0,612$). L'albumine étant un test d'évaluation du fonctionnement du foie, les résultats trouvés indiquent que la fonction du foie n'est pas altérée.

L'administration du Tanakan a montré une légère élévation des taux d'albumine totale par rapport aux témoins ($p= 0,414$) à la première semaine qui diminue à la deuxième semaine pour ne montré aucune différence significative par rapport aux témoins ($p= 0,453$). Les concentrations de l'albumine observées à la troisième semaine ont présenté une légère tendance à l'augmentation ($p= 0,915$).

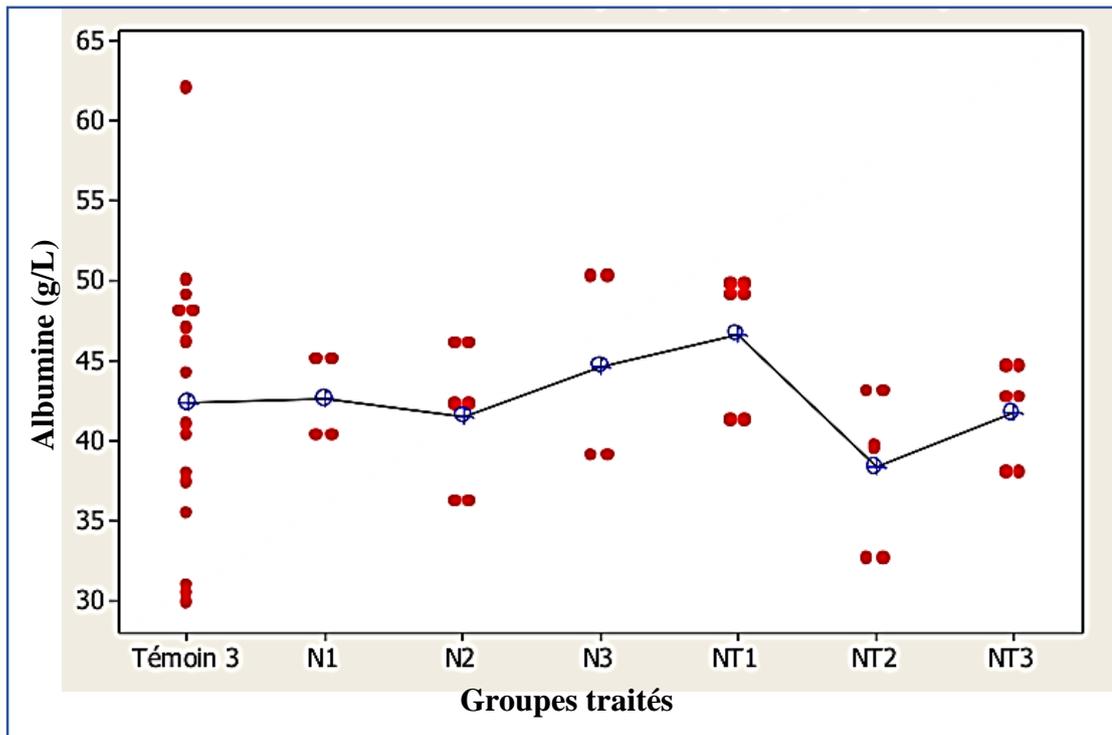


Figure20 : Variation du teneur plasmatique en Albumine des lapins témoins et traités pendant la période du traitement

III.5/ Bilirubine totale :

Les taux de bilirubine totale ont montré une différence entre les deux lots d'animaux traités avec une évidence de l'effet positif de l'administration du Tanakan sur ce paramètre fonctionnel hépatique qui est un marqueur de la fonction hépatique d'élimination.

Ainsi, les lapins traités avec le nitrite de sodium seul ont présenté des taux statistiquement élevés de bilirubine totale par rapport aux témoins ($p= 0,00$) durant les trois semaines après l'arrêt du traitement mais cette élévation diminuait avec le temps de manière significative.

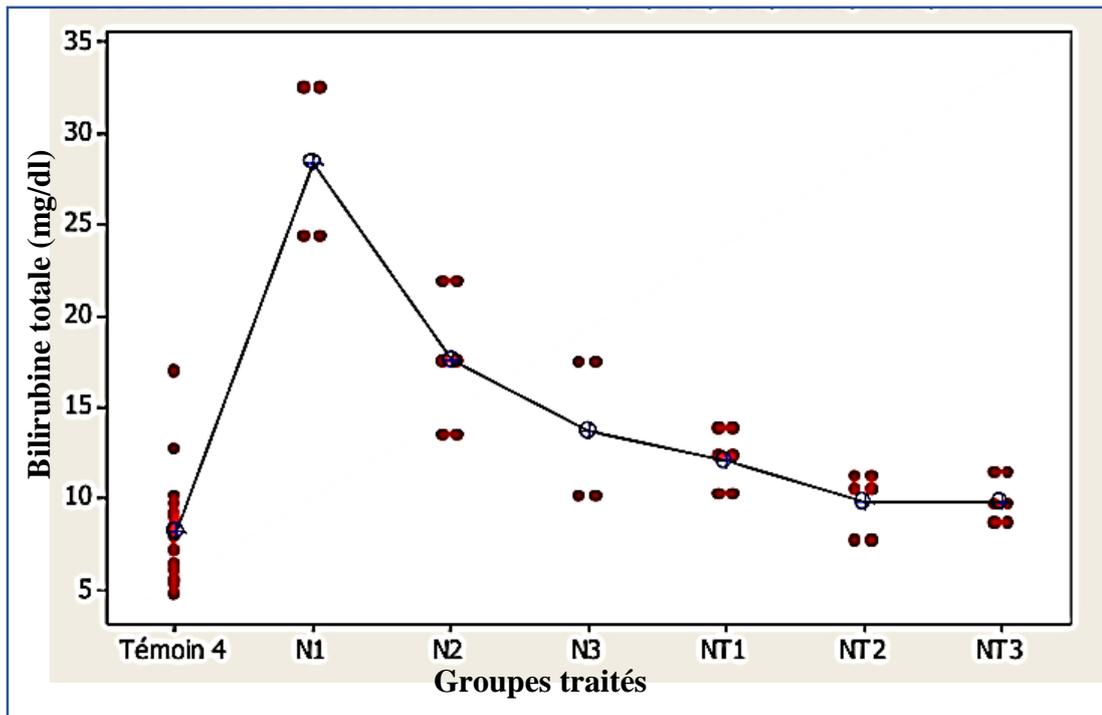


Figure21 : Variation du teneur plasmatique en Bilirubine totale des lapins témoins et traités pendant la période du traitement

III.6/ La bilirubine Directe :

Les résultats de la bilirubine directe ont présenté le même profil que celui de la bilirubine totale avec un effet positif de l'administration du Tanakan.

Ainsi, une différence significative entre les lapins traités avec le nitrite de sodium seul par rapport aux témoins ($p= 0,000$) à la 1^{ère} semaine après l'arrêt du traitement puis cette élévation diminuait avec le temps de manière significative ($p= 0,000$ après la 2^{ème} semaine/témoins et $p= 0,006$ après la 3^{ème} semaine / témoins).

L'administration du Tanakan a donné des résultats différent significativement par rapport aux témoins ($p= 0,001$) à la 1^{ère} semaine après l'arrêt du traitement puis cette élévation diminuait avec le temps de manière significative ($p=0,211$ après la 2^{ème} semaine/témoins et $p= 0,377$ après la 3^{ème} semaine / témoins).

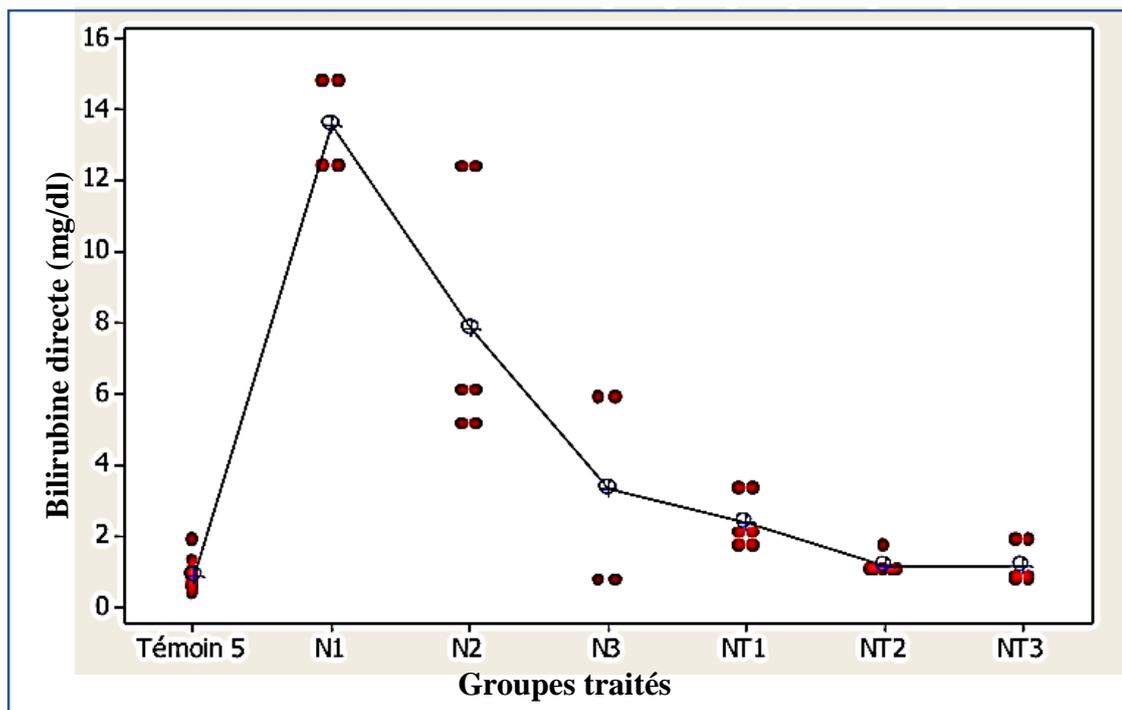


Figure 22 : Variation du teneur plasmatique en Bilirubine directe des lapins témoins et traités pendant la période du traitement

Discussion

Le nitrite est un important toxique environnemental qui affecte la santé humaine et animale à travers le monde. En situation physiologique, le nitrite joue un rôle vital dans la fonction normale du corps ; il agit comme vasodilatateur, bronchodilatateur et relaxant intestinal (**Nujic et Habuda-Stanic, 2017**). Cependant, le nitrite à fortes doses agit comme un pro-oxydant et pro-cancérogène et provoque l'hypoxie, l'ischémie, le stress oxydatif, la méthémoglobinémie et l'altération du métabolisme énergétique entraînant des dommages aux organes. (**El-Nabarawy et al., 2020**)

Dans notre étude, nous avons essayé d'évaluer l'effet de l'extrait standardisé du *Ginkgo biloba* sous forme commercialisée qui est le Tanakan administré pendant trois semaines sur les altérations hépatiques induites par les nitrites libérés par le nitrite de sodium après six semaines de gavage. Cette évaluation a été faite sur le plan général estimé par la croissance des lapins, par les changements dans le poids hépatique et par le suivi des paramètres sériques et fonctionnels du foie. Ceci a été réalisé en parallèle avec des lapins à qui rien n'a été administré afin de voir si la régression de l'atteinte hépatique pouvait être spontanée.

L'analyse des résultats obtenus au terme de notre travail ont montré que le lot traité par le nitrite de sodium seul et le lot traité par le nitrite de sodium et par le Tanakan n'ont pas subi un changement dans l'ensemble ni dans le poids total des animaux ni dans le poids du foie au cours de la période d'expérimentation. Différents travaux ont été réalisés sur des rats et des souris afin de connaître l'effet des nitrites sur la croissance des animaux à court terme et après exposition chronique. Ces études ont montré que l'administration du NaNO_2 était soit sans effet sur le gain de poids de l'animal ou bien elle pouvait le réduire. Ainsi un travail présenté par le National Toxicology Program (2001) montre une diminution du poids corporel chez les souris B6C3F1 en utilisant une concentration de 990 mg/kg après 13 semaines de consommation journalière ainsi qu'une diminution du poids du foie à partir de la concentration de 750 mg/kg et chez les rat Wistar, les mêmes observations ont été retrouvées à la dose de 310 mg/kg. Egalement, une étude réalisée sur des rats sur une durée de 6 mois avec une concentration de NaNO_2 de 30 mg/kg a montré une diminution hautement significative du poids de l'animal et celle du rapport hépato-somatique (**Helal et al, 2008**). Par contre, le travail de Amini et ses collaborateurs (2018) a été réalisé sur des souris traitées avec du NaNO_2 à 50 mg/kg durant 60 jours n'ont pas trouvé de variations dans le poids corporel (**Sarah et al, 2018**). Nous avons utilisé dans notre travail une concentration de 100 mg/kg qui est nettement inférieure pendant 6 semaines, cette différence expliquerait la stabilité de la croissance des lapins traités.

L'administration orale du nitrite de sodium à 100 mg/kg a induit une hépatotoxicité avec une augmentation significative des niveaux des transaminases (TGO et TGP). Nos résultats sont bien confortés par les données publiées précédemment (**Morteza et al., 2019 ; El-Nabarawy et al., 2020**). Le TGO et le TGP sont des enzymes du métabolisme des acides pyruvique et oxaloacétique, le TGP est essentiellement localisé dans le foie au niveau du cytoplasme des hépatocytes, le TGO est localisé à l'intérieur des mitochondries (**Baghriche, 2008**). L'élévation des transaminases est le signe d'une atteinte hépatocellulaire prédominante de type nécrose ; surtout celle de la TGP qui est spécifique du foie, la TGO l'étant moins. La perturbation dans l'équilibre de l'activité de ces enzymes hépatiques pourrait être attribuée aux effets toxiques des composés nitroso formés dans l'environnement acide de l'estomac causant une nécrose hépatique sévère (**Abdel-Rahman et al., 2018**).

Les valeurs stables du dosage de l'Alcaline phosphatase (ALP) chez les lapins traités avec le NaNO₂ sont en faveur de la nécrose hépatique car cette enzyme, qui se trouve majoritairement dans le foie, est un marqueur de cholestase. D'une part **Morteza et al. (2019)**, a démontré qu'il y a une augmentation des taux d'ALP en administrant 80mg/Kg du nitrite de sodium à des rats Wistar pendant 60 jours. Cette différence avec nos résultats serait due probablement à la durée du traitement.

Le dosage de l'albumine, marqueur permettant d'apprécier la fonction synthétique du foie, chez le groupe traité par du nitrite de sodium ne montre aucun changement de ces valeurs. D'autre part **Omowumi et al. (2019)** a montré une diminution des taux d'albumine des rats Wistar après une seule dose du nitrite de sodium. Il a expliqué cette diminution par la perte d'hépatocytes en raison des dommages causés par le nitrite de sodium.

Les résultats de la bilirubine totale et directe du groupe traité par le nitrite de sodium sont également supérieurs à la normale, **Mohamed et al. (2013)** explique que ces résultats sont liés à des ruptures de la paroi endothéliale de la veine hépatique centrale. La bilirubine totale, produit de dégradation de l'hémoglobine, se partage en bilirubine directe (conjuguée) et indirecte (non conjuguée). La bilirubine directe est un indicateur de la fonction hépatocytaire d'élimination. L'élévation de la bilirubine conjuguée se rencontre en cas d'incapacité à la sécréter ou à l'excréter. L'élévation de la bilirubine conjuguée reflète donc plus fidèlement une maladie hépatique causée par une cholestase intra-hépatique due probablement à une inflammation hépatique.

Le groupe traité par le nitrite de sodium a montré une augmentation de la GGT pendant la première semaine du traitement. **Helal (2001)** montre que cette augmentation est due à la libération de ces enzymes dans le plasma en grandes quantités après les dommages hépatocellulaires induits par le nitrite de sodium. La GGT est une enzyme incorporée dans la membrane plasmique de l'hépatocyte, principalement dans le domaine canaliculaire, et sa libération dans le sérum indique des dommages à la cellule (**El Mesallamy et al., 2011**). La diminution des concentrations de la GGT est un signe de l'amélioration spontanée de l'altération hépatique.

L'extrait de ginkgo biloba (EGb) possède diverses activités biologiques et différents effets pharmacologiques, à savoir effet antioxydant, effet anti-inflammatoire et effet modulateur de la réponse immunitaire (**Pehlivan et al., 2002**). Il peut aussi améliorer la microcirculation sinusoidale, diminuer l'inflammation et empêcher la fibrose hépatique. (**Liu et al., 2006**).

Dans notre expérimentation, nous avons observé que les lapins mis sous l'administration de l'extrait de Ginkgo biloba standardisé (EGb 761) à raison de 20 mg/kg après le traitement par le nitrite de sodium ont présentés une amélioration de la TGO, la TGP, la bilirubine avec des taux d'albumine et de APL normaux. Ces résultats concordent avec ceux d'**Al-Attar, 2012 ; Yan-Jun et al (2004)**. Ce dernier montre que l'EGb était efficace pour inverser la cirrhose hépatique.

L'effet protecteur, préventif ou curatif, de l'EGb 761 au niveau du foie a été rapporté par nombre d'études ayant des objectifs différents. L'administration de l'EGb était bénéfique contre l'hépatocarcinogénèse par son action antioxydante, antiangiogénique et antigénotoxique (**El Mesallamy et al., 2011**), dans la régénération hépatique après hépatectomie partielle (**Günay et al., 2018**), contre la toxicité hépatique induite par l'alcool (**Yuan et al., 2007**), par une thyroïdectomie (**Tousson et al., 2014**) et dans le dysfonctionnement induit par le D-Galactose lié à l'âge (**Shwan et al., 2014**).

Il a été utilisé dans le cas de l'hépatotoxicité induite avec le CCl₄ qui est caractérisée par la présence d'une nécrose hépatique associée à une infiltration cellulaire et une dégénérescence vacuolaire des hépatocytes ainsi qu'une fibrose hépatique. Son utilisation a été avec une dose de 150 mg/kg deux semaines avant l'injection du CCl₄ et 2 semaines après ; la majorité des cellules sont redevenues normales (**Khattab, 2012**). Cette étude ainsi que celle d'He et son équipe (2006) ont montré que cet effet était due à l'action antioxydante de l'EGb (**He et al., 2006**). L'étude de Chávez-Morales et ses collaborateurs (2010) a été faite avec une seule dose orale de CCl₄ et un prétraitement avec 4 mg/kg de EGb pendant 5 jours, le résultat était la prévention

contre la majorité des altérations induites par le CCl₄ (**Chávez-Morales et al., 2010**), ce prétraitement agit à travers la régulation des cytokines proinflammatoires et profibrotiques à savoir le TNF- α et l'IL-6. D'autres mécanismes ont été proposés dans l'inhibition de la dégénérescence des hépatocytes et de la fibrose hépatique par l'EGb tels que l'inhibition de l'inflammation et l'inhibition de l'activation/apoptose des cellules stellaires hépatiques à travers les voies de signalisation p38 MAPK et le facteur NF-kappa B/ I κ B α . L'inhibition de l'apoptose des hépatocytes par la voie de signalisation Bcl-2/Bax, la diminution de l'expression du Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) et celle de l'ARN m du collagène I, l'inhibition de l'expression de TIMP-1 avec augmentation de la MMP-1 (**Luo et al., 2004 ; Liu et al., 2006 ; Wang et al., 2015**).

En effet, l'amélioration des paramètres biochimiques sériques du foie par l'utilisation du Tanakan serait liée au fait que l'administration du NaNO₂ induit une méthémoglobinémie, un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants (augmentation des taux de MDA, diminution des taux de GSH, de catalase et de SOD), une activation de l'apoptose en augmentant le taux de la protéine pro-apoptotique Bax contre une diminution de la protéine Bcl₂, une activation du gène de la caspase 3 dans le tissu hépatique (**El-Nabarawy et al., 2020**).

L'administration de l'EGb réduit efficacement l'activité sérique élevée de la GGT pendant la première semaine. Ces résultats sont conformes aux ceux de **El Mesallamy et al. (2011)**. Dans les deux dernières semaines nous avons remarqué l'augmentation de cette activité. Cette élévation serait due probablement soit à une altération d'un autre tissu surtout rénal puisque la GGT n'est pas une enzyme spécifique au foie sauf que du fait de la taille de ce dernier l'origine sérique de la GGT est majoritairement hépatique, soit à une induction enzymatique par le Tanakan lui-même.

Conclusion

La présente étude vise à évaluer d'une part la réponse hépatique induite par les nitrites et d'autre part à montrer les effets de l'extrait de *Ginkgo Biloba* (en utilisant le Tanakan) sur le développement de cette dernière. Des paramètres biochimiques de la fonction hépatique ont été mesurés pour des lapins témoins et traités par le nitrite de sodium et/ou Tanakan durant la période du traitement.

A la lumière de nos résultats, nous avons conclu que l'exposition à des fortes doses de nitrite de sodium entraîne une hépatotoxicité qui se manifeste par l'augmentation des taux sériques de transaminases (TGO et TGP), bilirubine totale et bilirubine directe et G-Glutamyl transférase. Et que la prise du tanakan fait améliorer l'état du foie en diminuant les taux des paramètres précédents.

Notre étude a montré que Le nitrite de sodium et le tanakan n'ont pas un effet sur la Phosphatase Alcaline et l'Albumine.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abdel-Kader R, Hauptmann S, Keil U, et al. 2007. Stabilization of mitochondrial function by Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Pharmacol Res.*; 56(6). Pp: 493–502.

Abdel-Rahman HG, Abd-El-Fattah ME, Youssef MF, Essawi EART, Elsedawy MEI .2018. The protective effect of different doses of alpha lipoic acid against hepatotoxicity of sodium nitrite in rat. *Int J Dev Res* 08(11) Pp: 24140–24145.

Allard M. Presse Med. 1986. Treatment of the disorders of aging with Ginkgo biloba extract. From pharmacology to clinical medicine. Pp : 1540-1545.

Atef M. Al-Attar.2013. Attenuating Effect of Ginkgo biloba Leaves Extract on Liver Fibrosis Induced by Thioacetamide in Mice- *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Pp 1-9.

B

Bastianetto S, Ramassamy C, Dore S, Christen Y, Poirier J, Quirion R. 2000. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *Eur J Neurosci* **12**. Pp : 1882– 90.

Bismuth H .2013. Revisiting liver anatomy and terminology of hepatectomies. *Ann Surg* 257 Pp: 383-386.

C

Chávez-Morales RM, Jaramillo-Juárez F, Posadas del Río FA, Reyes-Romero MA, Rodríguez-Vázquez1 ML et MC Martínez-Saldanã. 2010. Protective effect of Ginkgo biloba extract on liver damage by a single dose of CCl4 in male rats- *Human and Experimental Toxicology*. 30(3) Pp: 209–216.

Christian Ude, Manfred Schubert-Zsilavec, Mario Wurglics. 2013. Ginkgo biloba Extracts: A Review of the Pharmacokinetics of the Active Ingredients-*Clin Pharmacokinet*. 52. Pp: 727-749.

D

DeFeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K. 2003. *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundam Clin Pharmacol* **17**. Pp : 405– 17.

E

Eman Helal. 2001. Progressive effects of the interaction of Sodium nitrite and sunset yellow on different physiological parameters in albino rats-The Egyptian Journal of hospital medicine.2 Pp: 23-46.

Emen Helal; Zahkok S; Ghada Z A Soliman; Al-Kassas, M; Abdel Wahed, H. 2008. Biochemical Studies On The Effect Of Sodium Nitrite And/Or Glutathione Treatment On Male Rats- The Egyptian Journal of Hospital Medicine. 30 Pp: 25–38.

G

Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. 2015. Orchestrating liver development-*Development* 142 Pp: 2094-2108.

Grant, D.M. 1991. Detoxification pathways in the liver. *J Inherit Metab Dis* 14 Pp: 421-430.

Guangli Li, Yonghui Xia, Yaling Tian, Yiyong Wu, Jun Liu; Quanguo He et Dongchu Chen.2019. Review—Recent Developments on Graphene-Based Electrochemical Sensors toward Nitrite-*Journal of The Electrochemical Society*. 166 (12) Pp: 881-895.

Guangjin Yuan, Zuojiang Gong, Junhua Li and Xi Li. *Phyther. Res.* 2007. *Ginkgo biloba* Extract Protects against Alcohol-induced Liver Injury in Rats. 21 Pp: 234–238.

H

Hala A.H. Khattab. 2012. Effect of *Ginkgo biloba* Leaves Aqueous Extract on Carbon Tetrachloride Induced Acute hepatotoxicity in rats.-*The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 48 Pp: 483– 495.

Hala O El Mesallamy, Nadia S Metwally, Mahmoud S Soliman, Kawkab A Ahmed et Mai M Abdel Moaty.2011. The chemopreventive effect of Ginkgo biloba and Silybum marianum extracts on hepatocarcinogenesis in rats- Cancer Cell International. Pp: 2-12.

Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. 1997. Antioxidant flflavonols and coronary heart disease risk. Lancet; 349(9053) Pp: 699.

J

Julie Corriveau.2009. Étude des concentrations toxiques de nitrite dans les cours d'eau d'un bassin versant agricole. Université du Québec.

Janssens D, Michiels C, Delaive E, Eliaers F, Drieu K, Remacle J. 1995. Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by Ginkgo biloba extract and bilobalide. Biochem Pharmacol **50**. Pp: 991– 9.

K

Kietzmann, T. 2017. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. Redox biology 11 Pp : 622-630.

Kilfoy B. A., Y. Zhang, Y. Park, T. R. Holford, A. Schatzkin, A. Hollenbeck, and M. H. Ward. 2011. Dietary nitrate and nitrite and the risk of thyroid cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study,- Int. J. Cancer, **129**, 160.

L

Leistner E, Drewke C. 2009. Ginkgo biloba and ginkgotoxin. J Nat Prod. 73(1). Pp: 86–92.

M

Mahady GB. 2002. Ginkgo biloba for the prevention and treatment of cardiovascular disease: a review of the literature. J Cardiovasc Nurs **16**. Pp: 21– 32.

Manahan, S.E. 2003. Biochemistry toxicological chemistry. 3^{ème} édition. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data Lewis Publisher. Pp. 160-180.

Marchall, W.J., Bangert, S.K.2004. Biochimie médicale : physiopathologie et diagnostic.5^{ème} édition. française. France. Elsevier. pp. 59-87.

McColl KEL.2007. Hostile environment of the gastroesophageal junction J Clin Gastroenterol 41(Supplement 2) Pp: 102-107.

Mdzinarishvili A, Kiewert C, Kumar V, et al. 2007. Bilobalide prevents ischemia-induced edema formation in vitro and in vivo. Neuroscience. 144(1) Pp: 217–22.

Modica S, Bellafante E, Moschetta A. 2009. Master regulation of bile acid and xenobiotic metabolism via the FXR, PXR and CAR trio. Front Biosci (Landmark Ed) 14 Pp: 4719-4745.

Mohamed F, Salama,Ahmed Abbas,Mohamed M, Darweish,Amany A, El-Hawwary et Mohammed M. H. Al-Gayyar. 2013. Hepatoprotective effects of cod liver oil against sodium nitrite toxicity in rats- Pharmaceutical Biology. 51 Pp, 1435-1443.

Mullaicharam Bhupathyaaj,2013. A Review on Evidence Based Practice of Ginkgo biloba in Brain Health-International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis. PP : 24-30.



Nagla A. El-Nabarawy, Ahmed S. Gouda, Mohamed A. Khattab et Laila A. Rashed. 2020. Effects of nitrite graded doses on hepatotoxicity and nephrotoxicity, histopathological alterations, and activation of apoptosis in adult rats-Environmental Science and Pollution Research. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07901-6>.

Nahide Ekici Günay, Sabahattin Muhtaroglu, Abdulkadir Bedirli. et Balkan Med J. 2018. Administration of *Ginkgo biloba* Extract (EGb761) Alone and in Combination with FK506 Promotes Liver Regeneration in a Rat Model of Partial Hepatectomy 35 Pp: 174-80.

Nakanishi K. 2005. Terpene trilactones from Ginkgo biloba: from ancient times to the 21st century. Bioorg Med Chem.; 13(17) Pp: 4987–5000.

Nakai H. 2011. Hepatic gene therapy. In: Monga Satdarshan P S, editor. Molecular pathology of liver diseases. Pp: 343-371.

Nujie M and Habuda-Stanic. 2017. Nitrates and nitrites, metabolism and toxicity. Scientific Professional Journal of Nutrition and Dietetics 6(2) Pp: 48–89.

O

Omowumi OyeronkeAdewale, Ekundayo StephenSamuel, ManjunathManubolu, KavithaPathakoti. 2019. Curcumin protects sodium nitrite-induced hepatotoxicity in Wistar rats-Toxicology Reports 6 Pp: 1006-1011.

P

Pehlivan M¹,Dalbeler Y, Hazinedaroglu S, Arikan Y, Erkek AB, Günal O, Türkçapar AG.2002. An assessment of the effect of Ginkgo Biloba EGb 761 on ischemia reperfusion injury of intestine- Hepato-gastroenterology. 49(43) Pp: 201-204

R

Rajender Reddy, K., Faust T. 2006. Liver Disease. SLACK Incorporated. USA. Pp: 321-332.

Ramassamy C, Longpre F, Christen Y. 2007. Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer's disease: is there any evidence? Curr Alzheimer Res.; 4(3) Pp: 253–62.

Rosenberg, E., Faris, R.A., Spray, D.C., Monfils, B., Abreu, S., Danishefsky, I., and Reid, L.M. 1996. Correlation of expression of connexin mRNA isoforms with degree of cellular differentiation. Cell adhesion and communication 4 Pp: 223-235.

S

Sandrine Fleur Chébékoué.2008. Évaluation du risque cancérigène associé à la contamination de l'eau potable de puits municipaux par les nitrates/nitrites dans certaines régions rurales du Québec. Université de Montréal.

Sarah Amini, Mohammad Reza Nikravesh, Mehdi Jalali, Alireza Fazel, Ariane Sadr Nabavi. 2018. Effect of chronic sodium nitrite administration on the expression of fibronectin in interstitial tissue of mice testis: An immunohistochemical study- Biomedical Research. 29 (1) Pp: 91-95.

Sendensky A, Dufour JF. 2011. Liver physiology. In: Clinical gastroenterology: chronic liver failure. Springer Science+Business Media. Pp: 33-45.

Shui-Xiang He, Jin-Yan Luo, Yue-Peng Wang, Yan-Li Wang, Han Fu, Jun-Li Xu, Gang Zhao, En-Qi Liu. 2006. Effects of extract from Ginkgo biloba on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats- World J Gastroenterol. 12(24) Pp: 3924-3928.

Shwan H.Sofy, Esmail S.Kekey & Sarab D.alshamaa. 2014. The Protective Role of Green Tae and Ginkgo biloba Extract against Aging Dysfunction Induced by D-Galactose in Rats. G.J.B.A.H.S. 3(3) Pp: 97-101.

Si-Tayeb K, Lemaigre F.P. and Duncan, S.A. 2010. Organogenesis and development of the liver. Developmental cell 18 Pp : 175-189.

Singh B, Kaur P, Gopichand, et al. 2008. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. Fitoterapia. 79(6) Pp: 401–18.

Song W, Guan HJ, Zhu XZ, Chen ZL, Yin ML, Cheng XF. 2000. Protective effect of bilobalide against nitric oxide-induced neurotoxicity in PC12 cells. Acta Pharmacol Sin 21. Pp: 415– 20.

Smith JV, Luo Y. 2004. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. Appl Microbiol Biotechnol 64. Pp: 465– 72.

T

Teris A.van Beek, Paola Montoro. 2009. Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals-Journal of Chromatography A. Pp: 2002-2032.

W

Wurglics M, Schubert-Zsilavec M. 2006. Hypericum perforatum: a ‘modern’ herbal antidepressant: pharmacokinetics of active ingredients. Clin Pharmacokinet.; 45(5) Pp: 449–68.

Y

Yan-Jun Luo, Jie-Ping Yu, Zhao-Hong Shi, Li Wang. 2004. Ginkgo biloba extract reverses CCl₄ –induced liver fibrosis in rats- World J Gastroenterol. 10(7) Pp: 1037-1042

Yi-Ling Yang, Ya-Wen Su, Ming-Chong Ng, Po-Kuan Chao, Li-Chu Tung et Kwok-Tung Lu.2006. Extract of Ginkgo biloba EGb761 Facilitates Extinction of Conditioned Fear Measured by Fear-Potentiated Startle-Neuropsychopharmacology . 32 Pp: 332–342.

Yuanyuan Wang, Rong Wang, Yujie Wang, Ruqin Peng, Yan Wu, Yongfang Yuan. 2015. Ginkgo biloba extract mitigates liver fibrosis and apoptosis by regulating p38 MAPK, NF- κ B/I κ B α , and Bcl-2/Bax signaling- Drug Design, Development and Therapy. 9 Pp: 6303–6317.

Yochum L, Kushi LH, Meyer K, et al. 1999. Dietary flflavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. Am J Epidemiol; 149(10) Pp: 943–9

Annexes

PRESENTATION

Réf. 20042, (60 Tests) Réf. 20043, (100 Tests) Réf. 20050, (450 tests) Réf. 200492, (220 tests)
 R1: 1 x 65 ml R1: 1 x 110 ml R1 : 9 x 50ml R1 : 2 x 110 ml
 R2: 20 x 3 ml (lyoph) R2: 10 x 10 ml (lyoph) R2 : 9 x 50 ml (lyoph) R2 : 2 x 110 ml (lyoph)

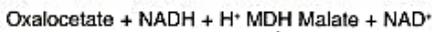
GOT-ASAT

Méthode cinétique IFCC
 sans phosphate de pyridoxal

PRINCIPE

Détermination cinétique de l'activité aspartate aminotransférase.

La réaction est initiée par addition de l'échantillon du patient au réactif. Le schéma réactionnel est le suivant:



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité aspartate amino transferase dans l'échantillon.

GOT: Transaminase glutamique oxaloacétique

MDH: Malate Dehydrogenase

CALCUL

à 340 nm $\Delta DO/\text{min} \times 1750 = U/l$

LINEARITE

Si la $\Delta DO/\text{min}$ à 340 nm est supérieure à 0.15, répéter le test en diluant l'échantillon au 1/10 avec une solution de NaCl à 9 g/l. Multiplier le résultat par 10.

VALEURS USUELLES

	25°C	30°C	37°C
Femmes	Jusqu'à 16 U/l	Jusqu'à 22 U/l	Jusqu'à 31 U/l
Hommes	Jusqu'à 19 U/l	Jusqu'à 26 U/l	Jusqu'à 38 U/l

REACTIFS

Réactif 1	Tampon Tris PH 7.8 à 30°C	80 mmol/l
Solution Tampon	L- aspartate	200 mmol/l
Réactif 2	NADH	0.18 mmol/l
Substrat	LDH	800 U/l
	MDH	600 U/l
	Oxoglutarate	12 mmol/l

REMARQUE

L'hémolyse peut interférer.

BIBLIOGRAPHIE

Bergmeyer H; Bower and Cols. Clin. Chim Acta 70, (1976)
 Bergmeyer H et Wahiegeld Clin. Chem 24, 58 (1978). minutes.

PREPARATION ET STABILITE

Reprendre le substrat R2 par 3 ml Réf (20042) ou 10 ml Réf (20043) de Tampon R1. Pour les Réf (20050) et (200492) reconstituer chaque R2 par un flacon R1. cette solution de travail est stable : 7 jours à 2-8°C.
 : 24 heures à 20-25°C.

ECHANTILLON

Sérum ou plasma hépariné sans hémolyse.

MODE OPERATOIRE

Longueur d'onde.....340 nm
 Température.....25-30-37°C
 Cuve.....1 cm d'épaisseur

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air ou l'eau distillée.

Solution de travail	1 ml	3 ml
Préincuber à la température choisie (25, 30 ou 37°C)		
Echantillon	100 µl	300 µl
Mélanger et incuber 1 minute. Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minutes.		



TECO DIAGNOSTICS
1268 N. Lakeview Ave.
Anaheim, CA 92807
1-800-222-9880

ALT (SGPT) REAGENT SET (UV-KINETIC METHOD)

INTENDED USE

For the quantitative determination of alanine aminotransferase in human serum.

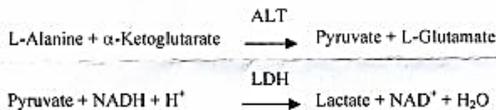
INTRODUCTION

The enzyme alanine aminotransferase is widely reported in a variety of tissue sources. The major source of ALT is of hepatic origin and has led to the application of ALT determinations in the study of hepatic diseases. Elevated serum levels are found in hepatitis, cirrhosis, and obstructive jaundice. Levels of ALT are only slightly elevated in patients following a myocardial infarction.¹

UV methods for ALT determination were first developed by Wroblewski and LaDue in 1956.² The method was based on the oxidation of NADH by lactate dehydrogenase (LDH). In 1980, the International Federation of Clinical Chemistry recommended a reference procedure for the measurements of ALT based on the Wroblewski and LaDue procedure.³ The ALT reagent conforms to the formulation recommended by the IFCC.

PRINCIPLE

The enzymatic reaction sequence employed in the assay of ALT is as follows:



The pyruvate formed in the first reaction is reduced to lactate in the presence of lactate dehydrogenase and NADH. The activity of ALT is determined by measuring the rate of oxidation of NADH at 340 nm. Endogenous sample pyruvate is converted to lactate by LDH during the lag phase prior to measurement.

REAGENT COMPOSITION

When reconstituted as directed, the reagent for ALT contains the following:

(Concentrations refer to reconstituted reagent): α -Ketoglutarate 13 mM, L-Alanine 400 mM, NADH 0.2 mM, LDH 800 U/L, Buffer 100 mM, pH 7.8 \pm 0.2. Non-reactive stabilizers and preservatives.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use.
CAUTION: In vitro diagnostic reagents may be hazardous. Handle in accordance with good laboratory procedures which dictate avoiding ingestion, and eye or skin contact.
- Specimens should be considered infectious and handled appropriately.
- Use distilled or deionized water where indicated.

STORAGE AND STABILITY

- Store dry reagent at 2 - 8°C (refrigerated).
- The reconstituted reagent is stable for thirty days (30) if immediately refrigerated and for twenty-four (24) hours at room temperature.

REAGENT DETERIORATION

The reagent should be discarded if:

- Turbidity has occurred; turbidity may be a sign of contamination.
- Misture has penetrated the vial and caking has occurred.
- The reagent fails to meet linearity claims or fails to recover control values in the stated range.
- The reconstituted reagent has a reagent blank absorbance less than 0.8 at 340 nm.

SPECIMEN COLLECTION

This assay is intended for use with serum. Reports indicate that ALT in serum remains stable at 4 - 8°C for a minimum of seven (7) days.⁴ Hemolyzed specimens should not be used as erythrocytes contain seven times the ALT activity of serum.

INTERFERING SUBSTANCES

Pyridoxal phosphate can elevate ALT values by activating the apoenzyme form of the transaminase.⁵ Pyridoxal phosphate may be found in water contaminated with microbial growth.

High levels of serum pyruvate may also interfere with assay performance. Young, et al., give a list of drugs and other substances that interfere with the determination of ALT activity.⁶

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Pipetting devices
- Test tubes/rack
- Timer
- Spectrophotometer with capability to read at 340 nm
- Heating bath/block (37°C)

GENERAL INSTRUCTIONS

The reagent for ALT is intended for use either as an automated procedure on chemistry instruments or as a manual procedure on a suitable spectrophotometer.

AUTOMATED PROCEDURE

Refer to appropriate application manual available.

MANUAL PROCEDURE

- Reconstitute reagent according to instructions.
- Zero spectrophotometer at 340 nm with distilled water.
- Pipette 1.0 ml of reagent into a test tube and allow to equilibrate to 37°C. If the spectrophotometer being used requires a final volume greater than 1.0 ml for accurate readings refer to ALTERNATE PROCEDURE.
- Add 0.10 ml (100 μ l) of specimen to reagent and mix gently.
- Maintain solution at 37°C. After 60 seconds, measure the absorbance at 340 nm.
- Take two additional absorbance readings at one (1) minute interval. Calculate the mean absorbance change per minute ($\Delta A/\text{min}$).
- Multiply the $\Delta A/\text{min}$ by 1768 to calculate IU/L of ALT activity.
- Sample with values above 500 IU/L should be diluted 1:1 with saline, re-assayed and the results multiplied by two (2).

NOTE: If the spectrophotometer being used is equipped with a temperature-controlled cuvette, the reaction mixture may be left in the cuvette while the absorbance readings are taken.

PROCEDURE NOTES (MANUAL)

Turbid or highly icteric samples may give readings whose initial absorbance exceeds the capabilities of the spectrophotometer. More accurate results may be obtained by using 0.05 ml (50µl) sample and multiplying the final answer by two (2).

CALCULATIONS

One International Unit (IU) is defined as the amount of enzyme that catalyzes the transformation of one micromole of substrate per minute under specified conditions.

$$\begin{aligned} \text{ALT (IU/L)} &= \frac{\Delta A/\text{min.} \times \text{TV} \times 1000}{\epsilon \times \text{SV} \times \text{LP}} \\ &= \frac{\Delta A/\text{min.} \times 1.10 \times 1000}{6.22 \times 0.1 \times 1.0} = \Delta A/\text{min.} \times 1768 \end{aligned}$$

Where: $\Delta A/\text{min.}$ = Average absorbance change per minute
TV = Total reaction volume (ml)
1000 = Conversion of IU/ml to IU/L
 ϵ = Millimolar absorptivity of NADH
SV = Sample volume (ml)
LP = Light path (cm)

Example: 1.480 = Initial absorbance
1.350 = absorbance after one (1) minute
 $\Delta A/\text{min.} = 1.480 - 1.360 = 0.12$

Then $0.12 \times 1768 = 212.2 \text{ IU/L}$

SI UNITS: To convert to SI Units (nkat/L) multiply IU/L by 16.67.

NOTE: If any of the test parameters are altered, a new factor must be calculated using the formula above.

ALTERNATE PROCEDURE

1. Reconstitute reagent according to instructions.
2. Pipette 2.8 ml of reagent into a test tube and allow to equilibrate to 37°C.
3. Add 0.2 ml (200µl) of specimen to reagent, and then mix gently.
4. Maintain solution at 37°C. After 1 minute, measure the absorbance at 340 nm. (A_1)
5. After exactly three (3) minutes, read and record.
6. The difference in absorbance between readings ($A_1 - A_2$) multiplied by the factor of 803.

ALTERNATE PROCEDURE CALCULATIONS

$$\text{ALT (IU/L)} = \frac{(A_1 - A_2) \times 3.0 \times 1000}{3 \times 1 \times 6.22 \times 0.2} = (A_1 - A_2) \times 803$$

($A_1 - A_2$) = absorbance change

Example: If $A_1 = 1.45$, $A_2 = 1.35$,

then $(1.45 - 1.35) \times 803 = 0.10 \times 803 = 80.3 \text{ IU/L}$

NOTE: If any of the above tests parameters have been altered, a new factor must be calculated using the above formula.

LIMITATIONS

The reagent is linear to 500 IU/L. Sample that have ALT values greater than 500 IU/L should be diluted 1:1 with saline, re-assayed and the results multiplied by two (2).

QUALITY CONTROL

It is recommended that controls be included in each set of assays. Commercially available control material with established ALT values may be routinely used for quality control. The assigned value of the control material must be confirmed by the chosen application. Failure to obtain the proper range of values in the assay of control material may indicate reagent deterioration, instrument malfunction, or procedure errors.

TEMPERATURE CORRECTION⁷

1. If the assay is performed at 37°C but is to be reported at 30°C, multiply the results by 0.7.
2. If the assay is performed at 30°C but is to be reported at 37°C, multiply the results by 1.43.

EXPECTED VALUES⁸

Up to 26 IU/L (30°C) Up to 38 IU/L (37°C)

It is strongly recommended that each laboratory establish its own normal range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. **Linearity:** 500 IU/L
2. **Comparison:** Studies between the present method and a similar method yield a correlation of 0.99 and a regression equation $Y = 0.98X + 1.32$.
3. **Precision studies:**

Mean (IU/L)	Within Run	
	S.D.	C.V. %
23.6	1.8	7.9
82.6	2.1	2.5

Mean (IU/L)	Run-to-Run	
	S.D.	C.V. %
23.4	1.9	8.0
82.4	1.9	2.3

REFERENCES

1. Henry, J.B.: *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, W.B. Saunders and Co., Philadelphia, PA. p 332-335 (1974).
2. Wroblewski, F. and LaDue, J.S.: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 91: 569 (1956).
3. International Federation of Clinical Chemistry, *J. Clin. Chem. Clin. Bio.* 18:5231(1980).
4. Henry, R.J.: *Clin. Chem. Principles and Techniques* 2nd Ed., Harper and Row, New York, p.822 (1974).
5. Rej, R., et al.: *Clin. Chem.* 19:92 (1973).
6. Young, D.S., et al.: *Clin. Chem.* 21:5 (1975).
7. Henry, R.J., et al.: *Amer. J. Clin. Path.* 34:381 (1960).
8. Tietz, N.W.: *Fundamentals of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA p. 682 (1976).

A525: 04/2012

Manufactured by:



TECO DIAGNOSTICS
1258 N. LAKEVIEW AVE.
ANAHEIM, CA 92807
U.S.A.



Authorized Representative:
Emergo Europe
Metersstraat 15
2513 BH The Hague
The Netherlands

BILIRUBINE TOTALE ET DIRECTE
Méthode Acide sulfanique
dans le plasma ou le sérum humains

CODE CND : PJ

REF 80403	R1 1 x 200/mL R2 1 x 200/mL RS 1 x 40/mL	Bilrubine Totale Bilrubine Directe Sérum/Plasma
REF 80445	R1 2 x 200/mL R3 1 x 40/mL	Bilrubine Totale Sérum/Plasma
REF 80553	R2 2 x 200/mL R3 1 x 40/mL	Bilrubine Directe Sérum/Plasma

CE

USAGE IN VITRO

INTERET CLINIQUE (1)
La bilirubine totale (BT) est le paramètre de référence pour le diagnostic de l'ictère. Elle est constituée de la bilirubine libre (BL) et de la bilirubine conjuguée (BC). L'augmentation de la BT est observée dans de nombreuses affections, en particulier dans l'ictère obstructif, l'ictère hémolytique, l'ictère hépatocellulaire et l'ictère physiologique du nouveau-né. La mesure de la BT permet de suivre l'évolution de l'ictère et de vérifier l'efficacité d'un traitement.

PRINCIPE (1)
La bilirubine est oxydée en bilirubine bilinéaire (BB) au cours de la réaction de l'azoture de sodium. Cette réaction est suivie d'une réduction par le réactif de Griess. Le produit formé est mesuré à 540 nm à l'aide d'un photomètre.

REACTIFS
Sérum ou plasma humain. Préparation du spécimen (2,3,4).

REACTIONS ET MATERIEL COMPLEMENTAIRES
Eppendorf et autres cuvettes à lecture automatisée.
Calibration (5)

PRECAUTIONS
Les réactifs BIOLABO sont destinés à un usage in vitro.

Validez l'intégrité des réactifs avant leur utilisation.
Ne pas pipeter avec la bouche.
En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau et consulter un médecin.
La teneur en sodium est inférieure à 10 mg/L.

Par mesure de sécurité, tester tout spécimen contre un pathogène infectieux. Respecter la législation en vigueur.

BIOLABO, tous les symboles, usage in vitro, Température de conservation : 2-8°C, Cuvettes à lecture automatisée. Souffler pour éliminer l'air.

Made in France

Version : 201707011

CONTRÔLE DE QUALITE
BIOLABO PATRIARCH CONTROL (valeurs pédiatriques)

- Tout autre degré de contrôle sera pour cette méthode et pour le BILIRUBINE TOTAL.
- Programme externe de contrôle de la qualité.
- Au moins un contrôle par série.
- Au moins un contrôle par 24 heures.
- Après validation de maintenance sur l'analyseur.

Langage valeur de contrôle se trouve en dehors des limites de confiance indiquées, expliquez les actions suivantes :

- Si la valeur obtenue est en dehors des limites, prélever un échantillon de contrôle supplémentaire et répéter le test.
- Avec l'aide du fabricant, vérifier les paramètres : longueur d'onde, température du réactif, temps de mesure et hauteur de cellule.
- Avec l'aide du fabricant, vérifier la stabilité de la hauteur de cellule.
- Si la valeur obtenue est en dehors des limites, calibrer à nouveau en utilisant un autre échantillon de contrôle.
- Si la valeur obtenue est en dehors des limites, calibrer à nouveau en utilisant un autre échantillon de contrôle.
- Si la valeur obtenue est en dehors des limites, calibrer à nouveau en utilisant un autre échantillon de contrôle.
- Si la valeur obtenue est en dehors des limites, calibrer à nouveau en utilisant un autre échantillon de contrôle.

INTERVALLES DE REFERENCE (1)
Bilrubine totale (mg/L) Bilrubine directe (mg/L)
Nouveau-né Prématurés à terme Prématurés à terme
Dans le sang 0-20 < 20 < 20 < 20
Dans l'urine 0-1 Jour < 80 < 100 < 100
1-2 Jours < 120 < 150 < 150
3-5 Jours < 180 < 200 < 200

Limite de linéarité
Avec l'aide du fabricant, vérifier la linéarité de la méthode.

PERFORMANCES PROCEDURE N°1
Précision : 1.2%
Exactitude : 1.5%Sensibilité : 0.1 mg/L

LETTE DE QUALIFICATION
BT : échantillon 10 mg/L (0.1 mmol/L)
BT : échantillon 10 mg/L (0.1 mmol/L)
BT : échantillon 10 mg/L (0.1 mmol/L)

BT : y = 0.0165x + 0.0513 r = 0.9876
BT : y = 0.002x - 0.0798 r = 0.9872

Made in France

Version : 201707011

MODE OPERATOIRE (TECHNIQUE MANUELLE)
Retirer les réactifs et spécimens à température ambiante.

Procédure n°1 :
Mélanger dans des tubes à essai :

Réactif R1	TOTAL		DIRECTE	
	Bleue	Blanc	Bleue	Blanc
Réactif R2	1/1	1/1	1/1	1/1
Eau distillée	9/1	9/1	9/1	9/1
Réactif RS (Mélange)	20 µL		20 µL	
Mélange	100 µL		100 µL	

Stabilité et durée de conservation : voir la notice de l'analyseur.

Température de conservation : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de transport : voir la notice de l'analyseur.

Température de livraison : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

Température de stockage : voir la notice de l'analyseur.

Température de mesure : voir la notice de l'analyseur.

SPINREACT



γ-GT

γ - GT

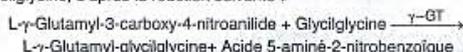
Substrat carboxylé. Cinétique

Détermination quantitative de gamma-glutamyl transférase (γ-GT) IVD

A conserver entre 2-8°C

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La gamma-glutamyl transférase (γ-GT) catalyse le transfert d'un groupe γ-glutamyl de la γ-glutamyl-p-nitroanilide au dipeptide accepteur glycylglycine, d'après la réaction suivante :



La vitesse de formation de l'acide 5-aminé-2-nitrobenzoïque déterminé par photométrie est proportionnelle à la concentration catalytique de γ-GT dans l'échantillon testé^{1,2}.

SIGNIFICATION CLINIQUE

La gamma-glutamyl transférase (γ-GT) est une enzyme qui est présente dans quasiment tous les tissus de l'organisme, elle apparaît notamment dans le foie, le pancréas, les reins et la prostate. La détermination des niveaux de gamma-glutamyl transférase (γ-GT) est la méthode la plus utile pour diagnostiquer et traiter les maladies hépatobiliaires telles que l'obstruction hépatique, la cirrhose ou les tumeurs hépatiques^{1,2,5,6}. Le diagnostic clinique doit être réalisé en tenant compte de toutes les données cliniques et de laboratoire.

RÉACTIFS

R 1	TRIS pH 8,25	100 mmol/L
Tampon		
R 2	Glycylglycine	100 mmol/L
Substrat	L-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide	3 mmol/L

PRÉPARATION

Réactif de travail (RT) :
 Réf: 1001185
 Dissoudre (→) un comprimé de R 2 Substrat dans un flacon de R 1 Tampon.
 Réf: 1001186
 Dissoudre (→) un comprimé de R 2 Substrat dans 15 mL de R 1 Tampon.
 Réf: 1001187
 Dissoudre (→) le contenu d'un flacon de R 2 Substrat dans 50 mL de R 1. Couvrir et mélanger délicatement jusqu'à dissoudre son contenu. Stabilité : 21 jours à 2-8°C ou 5 jours 15-25°C (15-25°C).

CONSERVATION ET STABILITÉ

Toutes les composantes du kit sont stables jusqu'à l'expiration de la date mentionnée sur l'étiquette en cas de conservation hermétique sous 2-8°C et de protection contre la lumière et les contaminations évitées lors de leur utilisation.

Ne pas utiliser les tablettes si elles semblent fragmentées.
 Ne pas utiliser les réactifs une fois passée la date indiquée.
 Indicateurs de détérioration des réactifs :

- Présence de particules et turbidité.
- Absorbances du témoin à 405 nm ≥ 1,80.

ÉQUIPEMENTS SUPPLÉMENTAIRES

- Spectrophotomètre ou colorimètre mesurant 405 nm.
- Bain thermostable à 25°C, 30°C ou 37°C (± 0,1°C)
- Cuves appariées de 1,0 cm de rôle spectrale.
- Équipement d'usage général pour laboratoire.

ÉCHANTILLONS

Sérum¹. Le γ-GT est stable pendant 3 jours à 2-8°C, 8 heures à 15-25°C et 1 mois à -20°C.

PROCÉDURE

- Conditions d'essai:
 Longueur d'onde: 405 nm
 Cuvette: 1 cm, de rôle spectrale
 Température constante: 25°C / 30°C / 37°C
 - Régler l'instrument à zéro dans l'eau distillée ou air.
 - Pipette dans une cuvette:
- | | |
|------------------|-----|
| RT (mL) | 1,0 |
| Échantillon (μL) | 100 |
- Mélanger, patienter 1 minute.

- Lire l'absorbance (A) initiale de l'échantillon, mettre en marche le chronomètre et lire l'absorbance chaque minute pendant 3 minutes.
- Calculer la moyenne de la différence d'absorbance par minute (ΔA/min).

CALCULS

ΔA/min x 1190 = U/L de γ-GT

Unités : L'unité internationale (UI) est la quantité d'enzyme qui convertit 1 μmol de substrat par minute, en conditions standard. La concentration est exprimée en unités par litre (U/L).

Facteurs de conversion de températures

Les résultats peuvent être transformés à d'autres températures en multipliant par :

Température de mesure	Facteur de conversion à		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1,00	1,37	1,79
30°C	0,73	1,00	1,30
37°C	0,56	0,77	1,00

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Il convient d'analyser des sérums de contrôle estimés en même temps que les échantillons: SPINROL H normal et pathologique (réf. 1002120 et 1002210). Si les valeurs obtenues se trouvent en dehors de la plage de tolérance, il faut revoir les instruments, les réactifs et la technique. Chaque laboratoire doit disposer de son propre système de contrôle de qualité et établir des actions correctives si les contrôles ne sont pas conformes aux tolérances.

VALEURS DE RÉFÉRENCE¹

	25°C	30°C	37°C
Femmes	4-18 U/L	5-25 U/L	7-32 U/L
Hommes	6-28 U/L	8-38 U/L	11-50 U/L

Ces valeurs sont approximatives. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence.

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

Gamme de mesure: de la limite de la détection de 0,000 U/L à la limite de linéarité de 375 U/L.
 Si les résultats obtenus sont plus élevés que la limite de linéarité, il faut diluer 1/10 avec CINA 9 g/l et multiplier le résultat par 10.
 Précision:

Moyenne (U/L)	Intra-essai (n= 20)		Inter-essai (n= 20)	
	40,0	199	41,6	200
SD	0,33	1,20	0,80	2,29
CV (%)	0,83	0,61	1,91	1,15

Sensibilité analytique: 1 U/L = 0,0008 ΔA/min.

Exactitude: les résultats obtenus en utilisant les réactifs SPINREACT n'ont pas présenté de différences systématiques en comparaison avec d'autres réactifs commerciaux (x).

Les résultats obtenus sur 50 échantillons ont été les suivants :

Coefficient de régression (r)² : 0,999.

Équation de la droite de régression : y=1,2253x - 2,0435.

Les caractéristiques de la méthode peuvent varier en fonction de l'analyseur utilisé.

INTERFÉRENCES

Ne pas utiliser de plasma. Les anticoagulants inhibent l'enzyme. L'hémolyse élevée interfère dans l'essai¹. Il a été rapporté que plusieurs drogues et autres substances interfèrent dans la détermination de la γ-GT^{3,4}.

NOTES

SPINREACT dispose d'instructions détaillées pour l'application de ce réactif dans différents analyseurs.

BIBLIOGRAPHIE

- Gardler S. γ-GT. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St. Louis, Toronto, Princeton 1984; 1120-1123.
- Farsijn J P et al. J Clin Chem Clin Biochem 1978; (14) 9: 421-427.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz NW et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRÉSENTATION

Réf: 1001185		R1: 20 x 2 mL, R2: 20 → 2 mL
Réf: 1001186	Cont.	R1: 1 x 150 mL, R2: 10 → 15 mL
Réf: 1001187		R1: 10 x 50 mL, R2: 10 → 50 mL



COD 11547 2 x 250 mL	COD 11573 1 x 250 mL
STORE AT 2-8°C	
Reagents for measurement of albumin concentration Only for in vitro use in the clinical laboratory	

ALBUMIN



ALBUMIN
BROMOCRESOL GREEN

PRINCIPLE OF THE METHOD

Albumin in the sample reacts with bromocresol green in acid medium forming a coloured complex that can be measured by spectrophotometry¹.

CONTENTS

	COD 11547	COD 11573
A. Reagent	2 x 250 mL	1 x 250 mL
S. Standard	1 x 5 mL	1 x 5 mL

COMPOSITION

A. Reagent: Acetate buffer 100 mmol/L, bromocresol green 0.27 mmol/L, detergent, pH 4.1.
S. Albumin Standard: Bovine albumin. Concentration is given on the label. Concentration value is traceable to the Standard Reference Material 927 (National Institute of Standards and Technology, USA).

STORAGE

Reagent (A): Store at 2-8°C.

Albumin Standard (S): Store at 2-8°C, once opened.

Reagent and Standard are stable until the expiry date shown on the label when stored tightly closed and if contaminations are prevented during their use.

Indications of deterioration:

- Reagent: Presence of particulate material, turbidity, absorbance of the blank over 0.200 at 630 nm (1 cm cuvette).
- Standard: Presence of particulate material, turbidity.

REAGENT PREPARATION

Reagent and Standard are provided ready to use.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Analyzer, spectrophotometer or photometer able to read at 630 nm (610 - 670 nm).

SAMPLES

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin) collected by standard procedures.

Albumin in serum is stable for 3 days at 2-8°C.

PROCEDURE

1. Pipette into labelled test tubes: (Notes 1, 2)

	Blank	Standard	Sample
Albumin Standard (S)	—	10 µL	—
Sample	—	—	10 µL
Reagent (A)	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

2. Mix thoroughly and let stand the tubes for 1 minute at room temperature.
3. Read the absorbance (A) of the Standard and the Sample at 630 nm against the Blank. The colour is stable for 30 minutes.

CALCULATIONS

The albumin concentration in the sample is calculated using the following general formula:

$$\frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Standard}}} \times C_{\text{Standard}} = C_{\text{Sample}}$$

REFERENCE VALUES

Serum²:

Newborn, 2 to 4 days	23-44 g/L
4 days to 14 years	38-54 g/L
Adult	35-50 g/L
> 60 years	34-46 g/L

These ranges are given for orientation only; each laboratory should establish its own reference ranges.

QUALITY CONTROL

It is recommended to use the Biochemistry Control Serum level I (cod. 18005, 18009 and 18042) and II (cod. 18007, 18010 and 18043) to verify the performance of the measurement procedure.

Each laboratory should establish its own internal Quality Control scheme and procedures for corrective action if controls do not recover within the acceptable tolerances.

METROLOGICAL CHARACTERISTICS

- Detection limit: 1.1 g/L.

- Linearly limit: 70 g/L.

- Repeatability (within run):

Mean Concentration	CV	n
26.2 g/L	1.4 %	20
42.1 g/L	1.0 %	20 ¹

- Reproducibility (run to run):

Mean Concentration	CV	n
26.2 g/L	1.9 %	25
42.1 g/L	1.8 %	25

- Trueness: Results obtained with this reagent did not show systematic differences when compared with reference reagents (Note 3). Details of the comparison experiments are available on request.

- Interferences: Bilirubin (>10 mg/dL), lipemia (triglycerides >7.5 g/L) and hemoglobin (>2.5 g/L) may affect the results. Other drugs and substances may interfere³.

These metrological characteristics have been obtained using an analyzer. Results may vary if a different instrument or a manual procedure are used.

DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS

Albumin is the most abundant protein in human plasma. It has three main functions: it contributes towards maintaining the colloid oncotic pressure of plasma, it acts as non-specific transport vehicle for many nonpolar compounds and it is a source of endogenous amino acids. Hyperalbuminemia is of little diagnostic significance except in dehydration².

Hypoalbuminemia is found as a result of several factors: reduced synthesis caused by liver diseases; reduced absorption of amino acids due to malabsorption syndromes or malnutrition; increased catabolism as a result of inflammation or tissue damage; altered distribution between intravascular and extravascular space due to increased capillary permeability, overhydration or ascites; abnormal losses caused by renal disease (nephrotic syndrome, diabetes mellitus, chronic glomerulonephritis, systemic lupus erythematosus), gastrointestinal tract disease (ulcerative colitis, Crohn's disease) or skin damage (exfoliative dermatitis, extensive burns); congenital absence of albumin or analbuminemia^{2,4}.

Albumin plasma concentrations, although important for management and follow-up, have very little value in diagnosis².

Clinical diagnosis should not be made on the findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

NOTES

1. This reagent may be used in several automated analysers. Instructions for many of them are available on request.
2. Albumin reaction with bromocresol green is immediate. It is not recommended to delay readings, since other proteins react slowly.
3. Calibration with the provided aqueous standard may cause a matrix related bias, specially in some analysers. In these cases, it is recommended to calibrate using a serum based standard (Biochemistry Calibrator, cod. 18011 and 18044).

BIBLIOGRAPHY

1. Dumas BT, Watson WA and Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971; 31: 87-96.
2. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.
3. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
4. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 2001.



DIAGNO-PAL

MÉTHODE IFCC

Pour la détermination in vitro de la phosphatase alcaline dans le sérum ou le plasma.

PRINCIPE DE LA METHODE

Le contrôle de la libération de p-nitrophénol par l'action de la phosphatase alcaline sérique sur le substrat p-Nitrophénylphosphate permet la mesure de l'activité enzymatique. Dans des conditions optimales de réaction, la ΔAbs_{405nm} est directement liée à la concentration de la phosphatase alcaline de l'échantillon.



INTERET CLINIQUE

La phosphatase alcaline est une enzyme dont la concentration sérique peut être modifiée par diverses maladies. Leur application clinique principale est dans le cas de maladie du foie obstructive, avec des élévations importantes de niveau de base, en particulier dans l'obstruction extra-hépatique. Aussi dans les maladies osseuses métaboliques associées à l'augmentation de l'activité ostéoblastique. L'augmentation de l'activité liée à une métabolisme osseux ne se produit que dans le cas de lésions ostéodéfectives.

COMPOSITION DU KIT

KIT 60 ml (Ref : B20005022)	A. 1 x 40 ml Solution tampon. (Ref : B20004021)	0,70 M
	B. 1 x 5 ml substrat. (Ref : B22001022)	
KIT 125 ml (Ref : B20012522)	A. 1 x 100 ml Solution tampon (Ref : B20010021)	1,55 mM
	B. 1 x 25 ml substrat. (Ref : B20002522)	
KIT 250 ml (Ref : B20025023)	A. 2x 100 ml Solution tampon (Ref : B20010021)	0,95 mM
	B. 1 x 50 ml substrat. (Ref : B20005022)	

Les concentrations dans la solution réactionnelle sont les suivantes:
Tampon 2-amino-2-méthyl-1-propanol pH 10,4
p-nitrophénylphosphate
HEDTA
Acétate de magnésium
Sulfate de zinc
Stabilisants et conservateurs

ECHANTILLON

Sérum ou plasma hépariné. Utiliser des échantillons exempts d'hémolyse. Conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C, les sérums sont stables pendant 7 jours.

S.A.R.L. DIAGNOPHARM
Zone D'activité Belazem Lot N°10 LAKHDARIA, BOUIRA



PERFORMANCE ET CARACTÉRISTIQUES DE FONCTIONNEMENT

Le fonctionnement du produit dépend tant du réactif que du système de lecture manuel ou automatique utilisé. Les résultats suivants ont été obtenus avec une technique de lecture.

Sensibilité : comme limite de détection : 5 U/LI.

Linéarité : L'essai est linéaire jusqu'à 1200 U/LI. Pour des concentrations plus élevées, diluer l'échantillon 1/10 avec une solution saline (NaCl 0,9%). Multipliez le résultat par 10.

Exactitude : le pourcentage de récupération est de 98,5 %.

Coefficient de variation dans le sérum : 2,2 %.

Justesse. Les résultats obtenus avec le réactif ne sont pas significativement différents par rapport au réactif de référence considéré.

L'étude détaillée de la performance du réactif est disponible sur demande.

INTERFERENCES

Les sérums hématoyés et lipémiés interfèrent avec l'essai. Ne pas utiliser d'anticoagulants de type EDTA, oxalate ou citrate en raison de leur effet chélateur sur les métaux chélateurs, qui provoque une inhibition de l'enzyme.

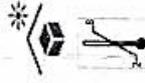
PRECAUTIONS PARTICULIÈRES

Le réactif contient de l'acide de sodium (0,09 %) comme conservateur. Les indications de sécurité sont sur l'étiquette des produits. Manipuler avec précaution. L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux normes en vigueur.

CONSERVATION ET STABILITE

Conservés entre 2 et 8 °C, les composants du kit sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Une fois les composants A et B mélangés, cette solution mono-réactive est stable pendant trois semaines entre 2 et 8 °C et une semaine à température ambiante (± 25 °C), toujours à l'abri de la lumière. Indications d'altération du réactif : Présence de particules ou de turbidité. Blanc du réactif de travail ± 1,500.

PICTOGRAMME



à l'abri du soleil

Conservé entre 2-8°C

Version: 00

www.diagnopharm-dz.com

