

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE LARBI TEBESSI-TEBESSA

DEPARTEMENT DES ETRES VIVANTS

MEMOIRE DE MASTER

Domaine science de la nature et de la vie

Fili er :sciences biologiques

option : pharmaco-toxicologie

Thème :

Médicaments de l'insuffisance hépatique chez l'homme

Devant le jury :

MOUICI Roumaissa

Elabor  par :

AYMEN Ghania

Devant Le Jury :

<i>Mr .DJABRI belgasse</i>	<i>MAA</i>	<i>Universit� de T�bessa</i>	<i>pr�sidente</i>
<i>Dr.BOUSSEKIN samira</i>	<i>MCB</i>	<i>Universit� de T�bessa</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mlle.BENAMARA amel</i>	<i>MAA</i>	<i>Universit� de T�bessa</i>	<i>Examineur</i>

Note :.....

Mention.....

Abstract

Drug-induced hepatotoxicity is a major public health problem, as it is the leading cause of liver failure.

The objective of the work is to evaluate antioxidant status during drug-induced liver failure.

Our study was conducted in the laboratory on 60 samples of subjects (men and women), of which 30 subjects represents the control group and 30 subjects with drug-induced hepatic insufficiency, to which we have determined the following biochemical blood parameters: glucose, urea, creatinine, direct and state bilirubin, proteins, albumin, cholesterol, transaminases, alkaline phosphatase, reduced glutathione, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, malondialdehyde.

Analysis of the results confirmed liver failure with depletion of plasma antioxidant defense and increased lipid peroxidation

It can be concluded that the severity of the disease is probably due to the decrease of antioxidant defense, and drugs likely to cause liver failure should be administered in combination with antioxidant molecules: trace elements (selenium, manganese, magnesium, zinc, copper), vitamins (E, C, ..)

Key words: liver failure, drugs, antioxidants, peroxidation, oxidative stress, biochemical balance.

المخلص

السمية الكبدية التي يسببها الدواء هي مشكلة صحية عامة كبرى ، لأنها السبب الرئيسي لفشل الكبد.

الهدف من العمل هو تقييم حالة مضادات الأكسدة أثناء فشل الكبد الناجم عن المخدرات.

أجريت دراستنا في المختبر على 60 عينة من الأشخاص (رجال ونساء) ، منها 30 شخصًا يمثلون المجموعة الضابطة و 30 موضوعًا يعانون من قصور كبدى محرض بالعقاقير ، وقد حددنا لها معايير الدم الكيميائية الحيوية التالية: الجلوكوز ، اليوريا ، الكرياتينين ، البيليروبين المباشر والدولة ، البروتينات ، الألبومين ، الكوليسترول ، الترانساميناز ، الفوسفاتيز القلوي ، انخفاض الجلوتاثيون ، الجلوتاثيون بيروكسيداز ، الجلوتاثيون-S-الترانسفيراز ، مالونديالدهيد.

وأكد تحليل النتائج فشل الكبد مع استنفاد الدفاع المضادة للأكسدة البلازما وزيادة بيروكسيد الدهون

يمكن أن نخلص إلى أن شدة المرض ربما ترجع إلى انخفاض دفاع مضادات الأكسدة ، ويجب إعطاء الأدوية التي تسبب فشل الكبد في تركيبة مع جزيئات مضادات الأكسدة: العناصر النزرة (السيلينيوم ، المنغنيز ، المغنيسيوم ، الزنك ، النحاس) ، والفيتامينات (E ، C ، ..).

الكلمات المفتاحية: فشل الكبد ، المخدرات ، مضادات الأكسدة ، بيروكسيد ، الإجهاد التأكسدي ، التوازن الكيميائي

الحيوي.

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 01	Principales hépatopathies médicamenteuses : pathogenèse et exemples de causes.	02
Tableau 02	Principales espèces réactives.	06

Liste des abréviations

4-AP	4-Aminophénazone.
4-HNE	4-Hydroxynonéal.
abs/min	Absorbance par minute.
AGE	Advanced glycation end products.
AGPI	Acide gras polyinsaturés.
ALAT	Aminotransférase.
AND	Acide désoxyribonucléique.
ARN	Acide ribonucléique.
ASAT	Aspartate aminotransférase.
ATP	Adenosine tri-phosphate.
BGC	Vert de bromocrésol.
C°	Degré Celsius.
CAT	Catalase.
c-Cu-Zn SOD	Cytosol superoxyde dismutases à cuivr-zinc.
C-DNB	Chlorodinitrobenzène.
CHE	Cholestérol estérase.
CHOD	Cholestérol oxydase.
CO₂	Dioxyde de carbone.
COX	Cyclo-oxygénases.

DEA	Diéthanolamine.
DMSO	Diméthylsulfoxyde.
DO	Densité optique.
DTNB	Acide 5-5' -dithio-bis-2-nitrobénoïque.
DTNB	Dithio-bis-2-nitrobenzoïque
e-Cu-Zn SOD	Endothéliale superoxyde dismutases à cuivre-zinc.
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique.
EMTX	Enzymes du métabolisme et du transport des xénobiotiques.
ERO	Espèces réactives de l'oxygène.
FMOs	Flavines mono-oxygénases.
GOD	Glucose oxydase.
GPx	Glutathion peroxydases.
GPx	Glutathion peroxydase.
GSH	Glutathion réduit.
GSSG	Glutathio oxidé.
GST	Glutathion S-transférases.
H	Heur.
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène.
H₂S	Acide sulfurique.
HOCl	Acide hypochloreux.
MDA	Malonyldialdéhyde.
MDH	Malate déshydrogénase..

Mn SOD	Super oxide dismutases à manganese.
MRPs	Multidrug resistance-associated proteins.
NaClO	Hypochlorite de sodium.
NADPH	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate oxide.
NAPQI	N-acétyl-p-benzoquinone imine.
NH	Ammoniaque.
NH₄	Ion ammonium.
NO	Monoxyde d'azote.
NO•	L'oxyde nitrique.
NO₂	Protoxyde d'azote.
NO₃-	•• Peroxynitrite.
NOS	Oxyde nitrique synthase.
O•	Superoxyde.
O₂•-	Anion superoxyde.
OH	Peroxyde d'hydrogène.
OH•	L'hydroxyle.
ONOO-	Peroxynitrite.
P	Seuil de signification.
PAL	Phosphatase alcaline.
PC	Protéines carbonylées.
p-Cu-Zn SOD	Plasma superoxyde dismutases à cuivre-zinc.
P-gps	P-glucoprotéines.

p-NPP	p-Nitrophenylphosphate.
POD	Péroxydase.
R•	Radical lipidique.
ROO•	Radical peroxyde.
ROOH	Hydro-peroxyde lipidique.
SOD	Super oxide dismutases.
t	Tours.
TBA	Acide thiobarbiturique.
TCA	Acide trichloracétique.
TGO	Oxaloacétate de glutamate transaminase.
TGP	Pyruvate de glutamate transaminase.
TP	Tompon phosphate.
UI	Unité internationale.
UPD-glucuronyltransférases	Uridine diphosphate glucuronyltransférases.

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Remerciements

Dédicace

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Tables des matières

Introduction

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Hépatotoxicité médicamenteuse	01
2. Différentes formes de l'hépatotoxicité médicamenteuse	01
2.1. Surdoses médicamenteuses	03
2.2. Insuffisance hépatique	03
3. Induction enzymatique et production des métabolites toxiques des médicaments	03
4. Paracétamol et hépatite	04
5. Stress oxydant induit par les médicaments	05
6. Stress oxydant	05
6.1. Définition de stress oxydatif	05
6.2. Espèces réactives oxydantes (ERO)	05
6.2.1. Définition	05
6.2.2. Formation des espèces réactives oxydantes (ERO)	06
6.2.2.1. ERO radicalaires	06

6.2.2.2. ERO non radicalaires	07
6.3. Atteintes cellulaires	08
6.3.1. Peroxydation lipidique	08
6.3.2. Oxydation des protéines	09
6.3.3 Oxydation des glucides	10
6.4. Les systèmes de défenses antioxydants	10
6.4.1. Superoxyde dismutases (SOD)	10
6.4.2. Les glutathions peroxydases (GPx)	11
6.4.3. Catalases	11
6.4.4. Glutathionne-S-transférase	11
6.5. Antioxydants non enzymatiques	11
6.5.1. Vitamine E	12
6.5.2. Vitamine C (acide ascorbique)	12
6.5.3. Glutathion réduit (GSH)	12

ETUDE EXPERIMENTALE

Matériel et méthodes

1. Protocole	13
2. Techniques de dosage	15
2.1. Dosage des paramètres biochimiques sériques	15
2.1.1. Dosage du glucose	15
2.1.2. Dosage de l'urée	16
2.1.3. Dosage de la créatinine	17
2.1.4. Dosage du cholestérol	18
2.1.5. Dosage de la bilirubine totale et directe	19
2.1.6. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)	20
2.1.7. Dosage des transaminases	21
2.1.8. Dosage des protéines totales	23
2.1.9. Dosage d'albumine	24
2.2. Exploration du stress oxydant plasmatique	25
2.2.1. Glutathion (GSH)	25

2.2.2. Glutathion S-transférase (GST)	26
2.2.3 Glutathion peroxydase (GPx)	26
2.2.4. Malondialdéhyde (MDA)	27
3. Méthode statistique	28
<u>2. Résultats</u>	
2.1. Etude des paramètres biochimiques sanguins	29
• Glycémie	29
• Urée et créatinine	30
• Cholestérol	31
• Bilirubine totale et directe	32
• Transaminases	33
• Phosphatase alcaline	34
• Protéines totales et albumine	35
2. Les marqueurs de la défense antioxydante plasmatiques	36
• Glutathion réduit (GSH) et Glutathion peroxydase (GPx)	36
• Glutathion-S-transférase (GST)	37
3. Marqueur de la peroxydation lipidique	38
• Malondialdéhyde (MDA)	38
<u>Discussion</u>	39
Conclusion générale et perspectives	43
Références bibliographiques	44
Annexes	50

Résumé

L'hépatotoxicité induite par les médicaments constitue un problème majeur de santé publique, puisqu'elle y représente la principale cause d'insuffisance hépatique.

L'objectif de travail consiste à évaluer le statut antioxydant au cours de l'insuffisance hépatique médicamenteuse.

Notre étude a été menée au laboratoire sur 60 échantillons de **sujets** (hommes et femmes), dont 30 sujets représentent le groupe témoin et 30 sujets atteints d'une insuffisance hépatique médicamenteuse, au quel nous avons dosé les paramètres biochimiques sanguins suivants : glucose, urée, créatinine, bilirubine totale et directe, protéines, albumine, cholestérol, transaminases, phosphatase alcaline, glutathion réduit, glutathion peroxydase, glutathion-S-transférase, malondialdéhyde.

L'analyse des résultats a confirmé l'insuffisance hépatique avec une déplétion de la défense antioxydante plasmatique et une augmentation de la peroxydation lipidique.

Nous pouvons conclure que la (**survenue**) gravité de la maladie est probablement due à la diminution de la défense antioxydante, et les médicaments susceptibles de provoquer une insuffisance hépatique doivent être administrés en association avec des molécules antioxydantes : oligoéléments (sélénium, manganèse, magnésium, zinc, cuivre), vitamines (E, C,..)

Mots clés : insuffisance hépatique, médicaments, antioxydants, peroxydation, stress oxydant, bilan biochimique.

II. Résultats

A. Etude des paramètres biochimiques sanguins

Tableau : Variation de la concentration sérique du glycémie , urée, créatinine, cholestérol , bilirubine totale et directe, l'activité de phosphatase alcaline, aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase, protéines totaux et l'albumine chez le lot témoin et les lots malades.

Paramètres	Lots expérimentaux	
	Lot témoin	Lot malade
Gly (g/l)	0.89 ± 0.10	1.85 ± 1.26 (***)
urée (g/l)	0.26 ± 0.09	0.28 ± 0.06
Créa (mg/l)	7.59 ± 1.70	8.21 ± 1.44
Chol (g/l)	1.81 ± 0.23	3.13 ± 0.34 (***)
BT (mg/l)	6.89 ± 1.24	26.82 ± 3.95 (***)
BD (mg/l)	1.03 ± 0.32	8.14 ± 1.37 (***)
PAL (U/l)	142.9 ± 57.53	405.26 ± 35.68 (***)
ASAT (UI/l)	30.7 ± 6.08	94.36 ± 12.98 (***)
ALAT (UI/l)	28.4 ± 5.72	93.76 ± 10.78 (***)
PT (g/l)	72.74 ± 3.24	41.39 ± 4.24 (***)
ALB (g/l)	40.63 ± 3.43	20.96 ± 2.24 (***)

(***) : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0.001$).

- Glycémie

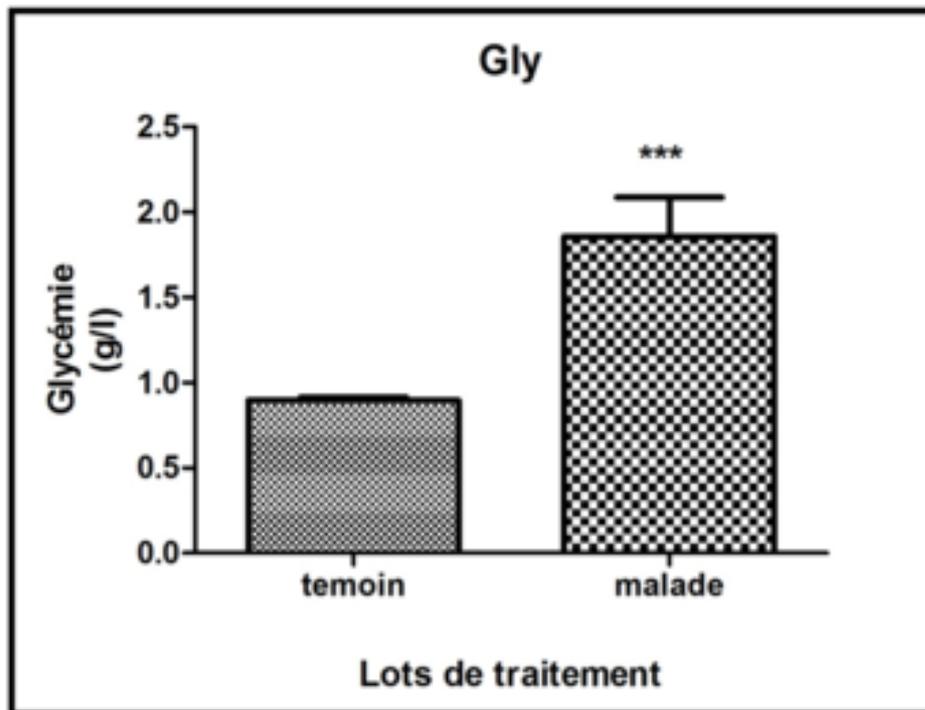


Figure. Variation de la concentration sérique du glucose chez le lot témoin et le lot malade.

Une augmentation de la glycémie est observée chez le lot malade par rapport aux témoins traités avec une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$).

- Urée

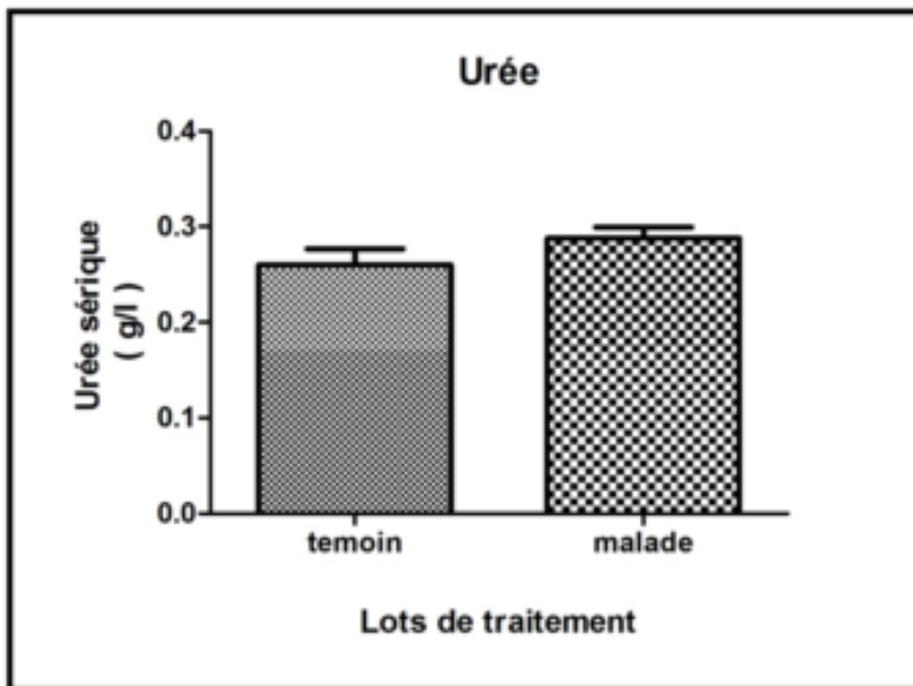


Figure 27. Variation de la concentration sérique en urée chez le lot témoin et le lot malade.

Aucune signification des paramètres de la fonction rénale (urée) chez le lot malade par rapport au témoin

- Créatinine

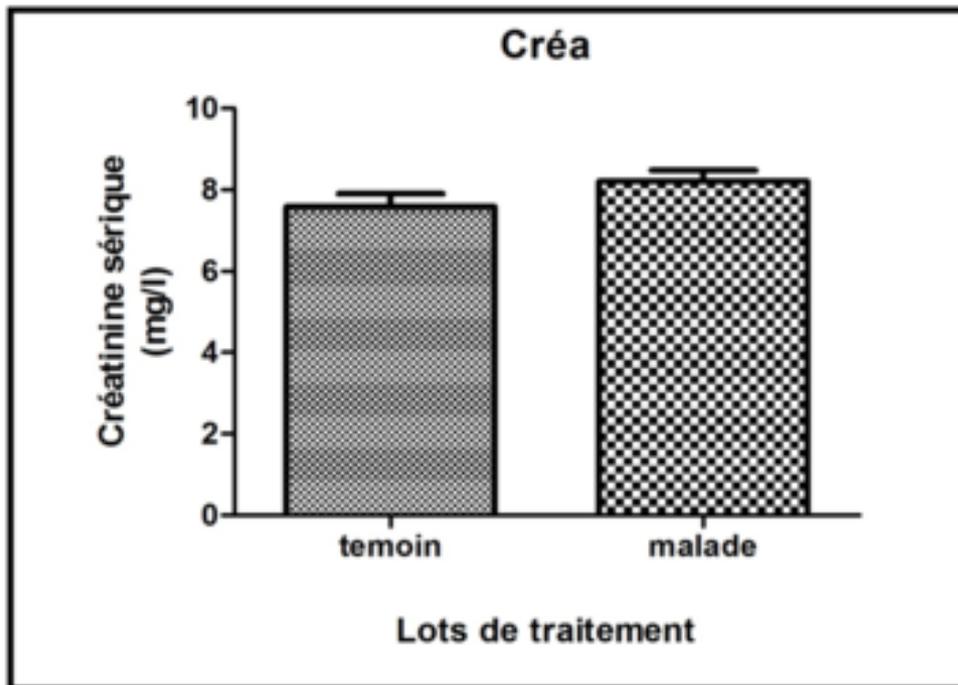


Figure 27. Variation de la concentration sérique en créatinine chez le lot témoin et le lot malade.

Aucune signification des paramètres de la fonction rénale (créatinine) chez le lot malade par rapport au témoin

- Cholestérol

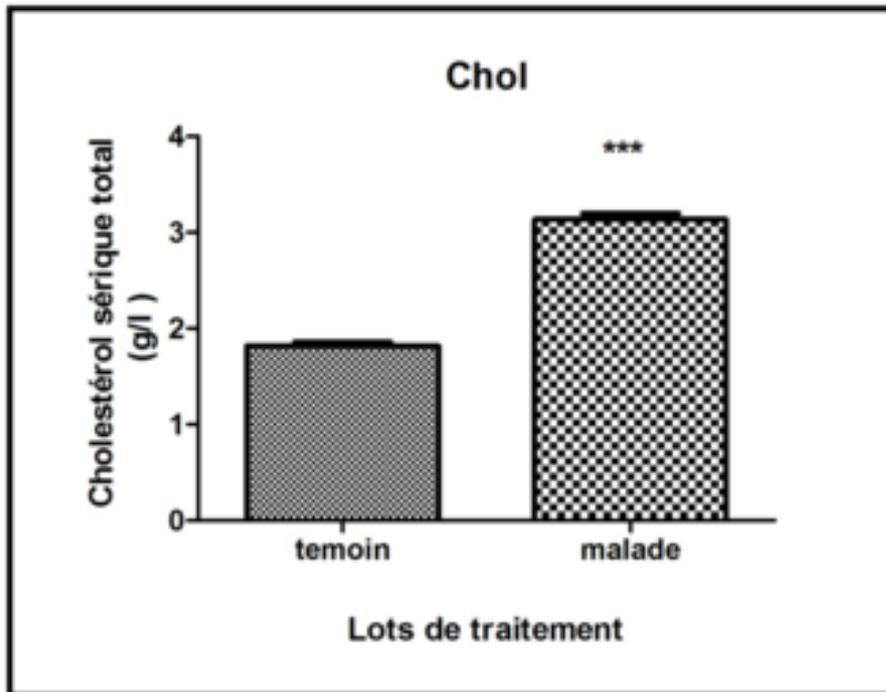


Figure . Variation de la cholestérolémie chez le lot témoin et le lot malade.

Nos résultats révèlent une augmentation de la cholestérolémie chez le lot malade avec une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) par rapport au lot témoin

- Bilirubine totale

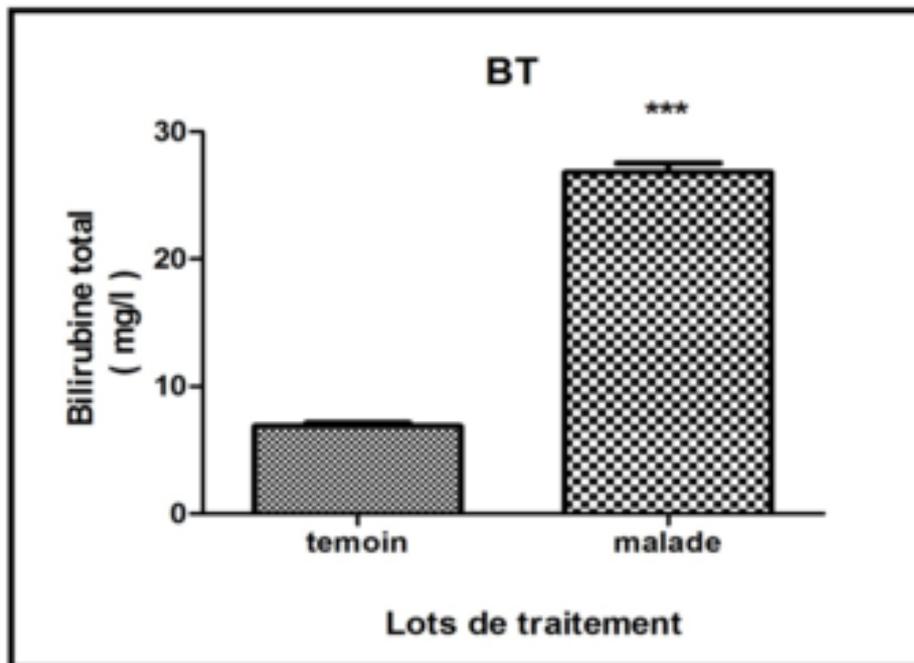


Figure . Variation du taux sérique de la bilirubine totale chez le lot témoin et le lot malade

Augmentation du taux de la bilirubine totale avec une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) par rapport au lot témoin

- Bilirubine directe

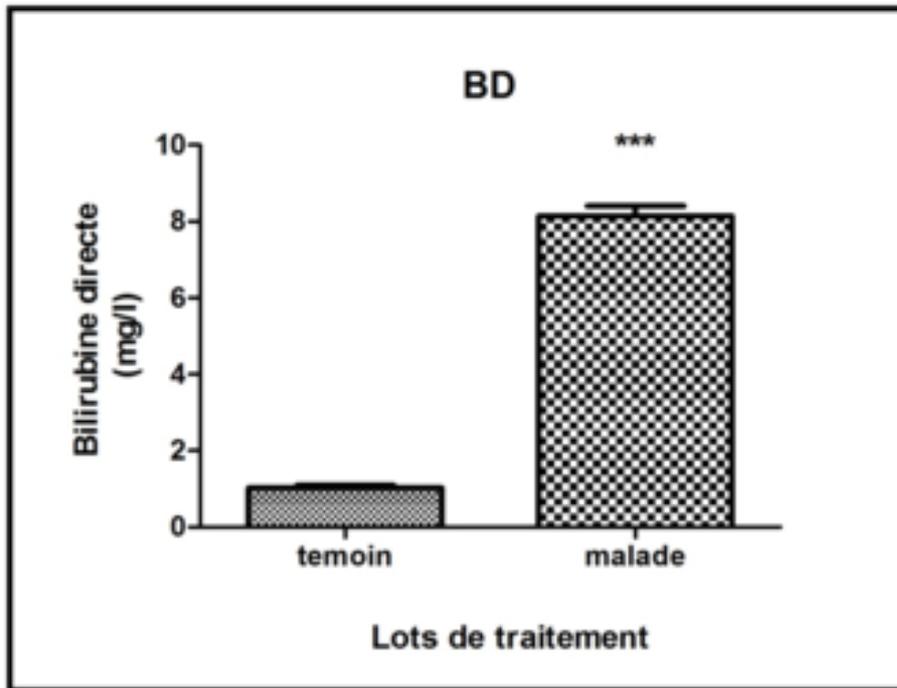


Figure . Variation du taux sérique de la bilirubine directe chez le lot témoin et le lot malade .

Augmentation du taux de la bilirubine directe avec une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) par rapport au lot témoin.

- Phosphatase alcaline

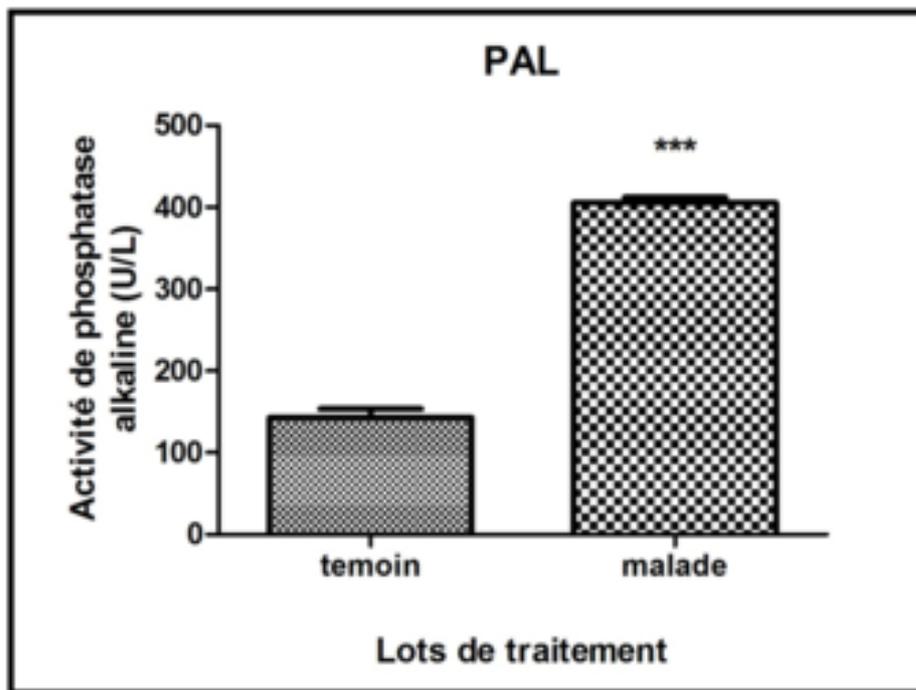


Figure . Variation de l'activité enzymatique de la PAL chez le lot traités et le lot malade.

Une augmentation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline avec une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$), à été enregistrée chez le lot malade par rapport aux lot témoin .

- Transaminases

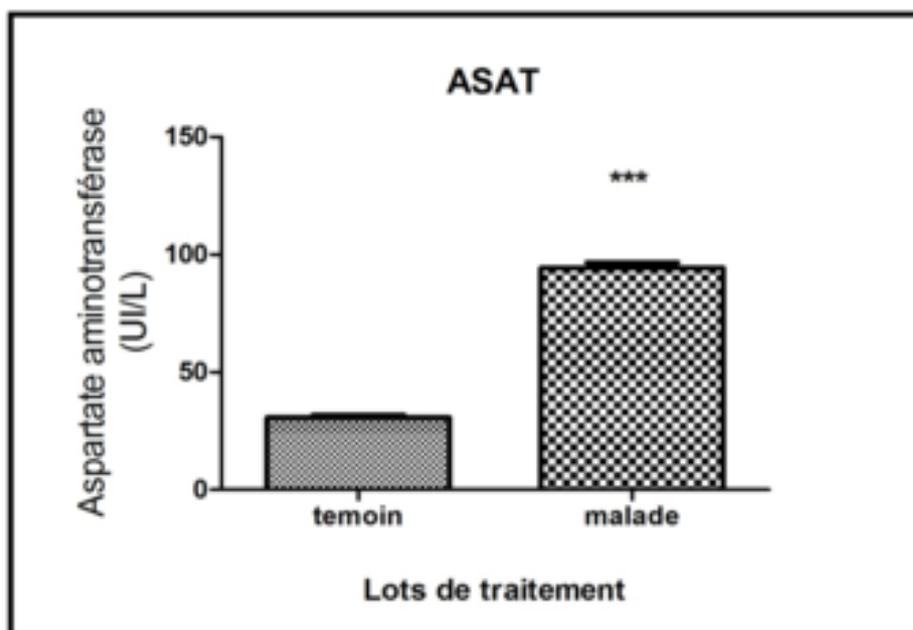


Figure. Variation de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT) chez le lot témoin et le lot malade.

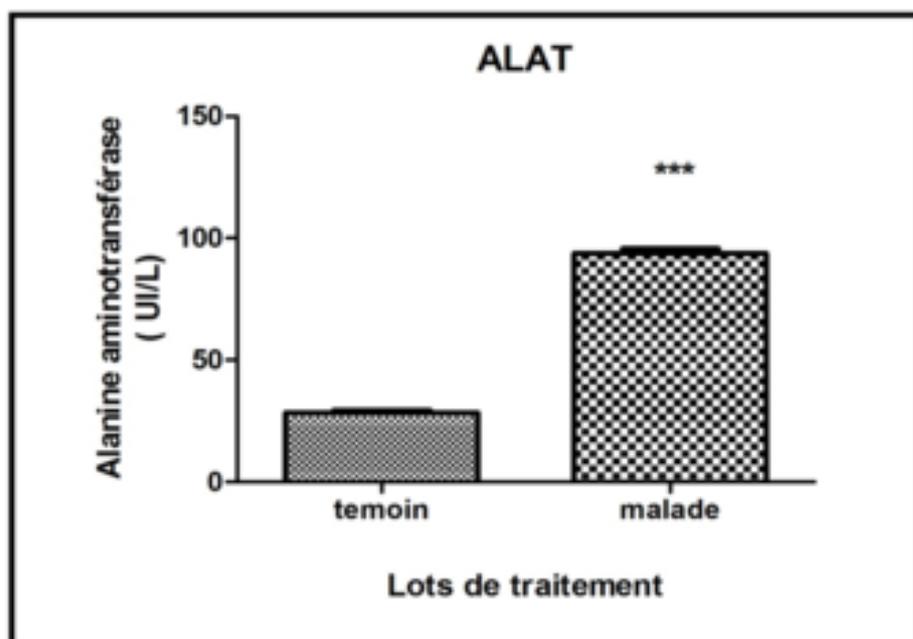


Figure. Variation de l'activité enzymatique des transaminases (ALAT) chez le lot témoin et le lot malade.

Les résultats obtenus révèlent une augmentation des transaminases (ASAT, ALAT) avec une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez le lot malade par rapport au lot témoin.

- Lipides totaux

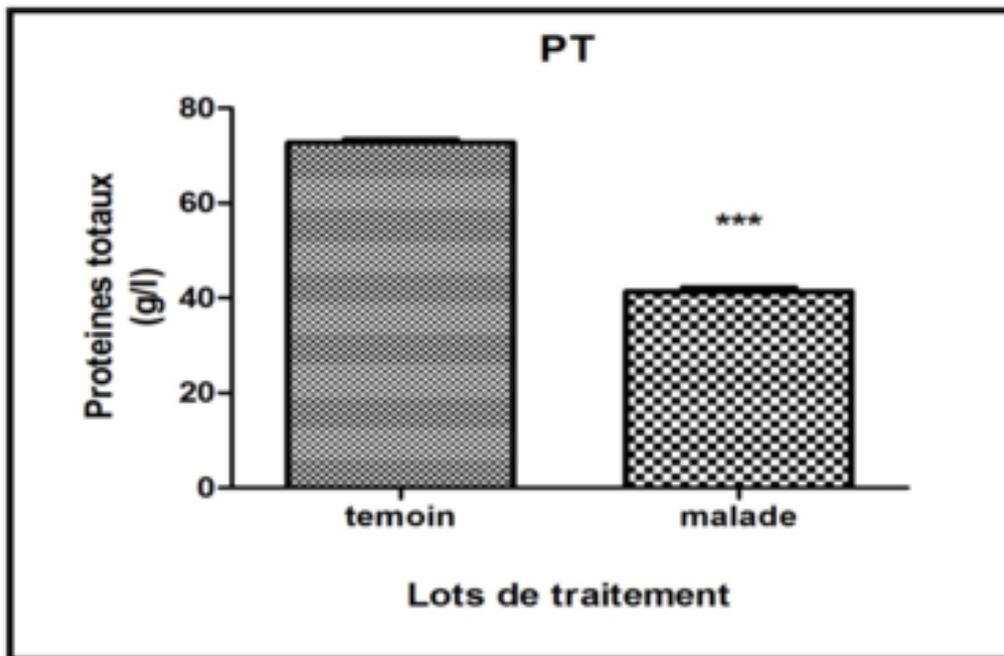


Figure . Variation de la concentration sérique des proteines totaux chez le lot témoin et le lot malade.

Une diminution des protéines totaux avec une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez le lot malade par rapport aux lot témoin.

- Albumine

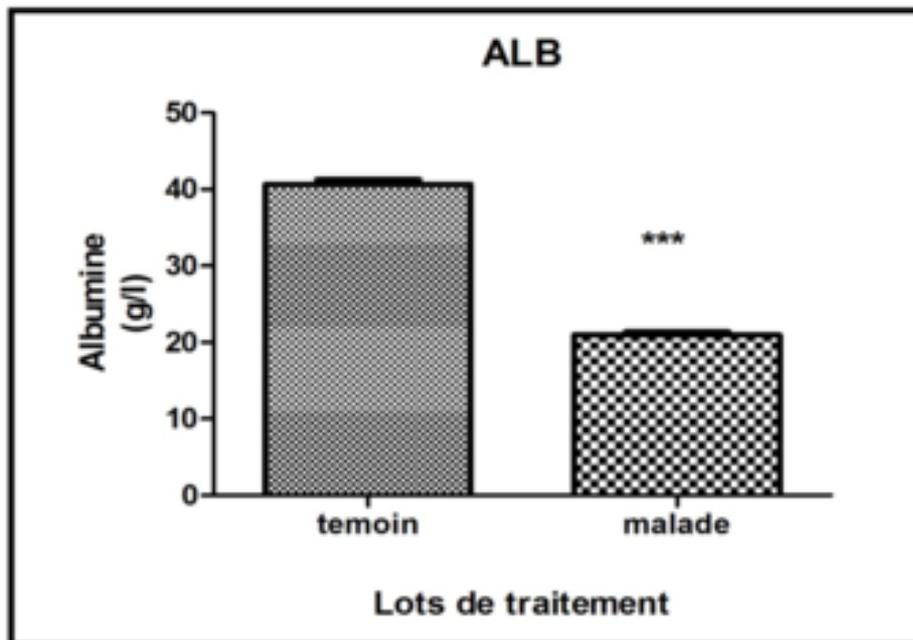


Figure . Variation de la concentration sérique d'albumine chez le lot témoin et le lot malade.

Une diminution d'albumine avec une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez le lot malade par rapport aux lot témoin.

1. Hépatotoxicité médicamenteuse

L'hépatotoxicité induite par les médicaments constitue un problème majeur de santé publique dans la majorité des pays, puisqu'elle y représente la principale cause d'insuffisance hépatique (**Keeffe, 2005**). Les médicaments pouvant endommager le foie sont habituellement catégorisés comme des agents hépatotoxiques intrinsèques (ex: acétaminophène, tétrachlorure de carbone) ou des composés idiosyncrasiques (ex: pénicilline, chlorpromazine), selon que la toxicité provoquée s'avère respectivement prévisible ou imprévisible (**Meeks et al., 1991**). En fait, les atteintes médicamenteuses prévisibles se distinguent des atteintes imprévisibles par différents critères tel que le cas Ainsi, dans le cas d'une toxicité intrinsèque (**Plaa et Hewitt, 1998**).

Cette toxicité imprévisible peut correspondre à un mécanisme immunologique dirigé contre les métabolites hépatiques du médicament, à un polymorphisme ou une mutation génique individuelle qui accélère ou induit la production de métabolites toxiques ,ou même aux deux mécanismes à la fois (**Plaa et Hewitt, 1998**).

2. Différentes formes de l'hépatotoxicité médicamenteuse :

Les dommages hépatiques mènent à des syndromes aiguës ou chroniques (**Meeks et al., 1991; Plaa et Hewitt, 1998**). D'une part, les atteintes aiguës peuvent s'avérer cytotoxiques (cytolytiques), c'est-à-dire caractérisées par un dommage important aux hépatocytes, cholestatiques (manifestées par un arrêt du flux biliaire et une jaunisse ou (ictère), ou une combinaison des deux. Les lésions cytotoxiques se caractérisent par une nécrose, une stéatose ou les deux (voir tableau 01),(**Meeks et al., 1991; Plaa et Hewitt, 1998**).

Les nécroses toxiques hépatiques sont intrinsèques, entraînent une réaction inflammatoire et mènent normalement à une jaunisse hépatocellulaire. De plus, les cas sévères peuvent aboutir à une insuffisance hépatique aiguë (**Meeks et al., 1991**). Quant aux stéatoses aiguës, elles sont microvésiculaires (formation de plusieurs petites vacuoles dans le cytoplasme), et se caractérisent par un pronostic grave (**Meeks et al., 1991; Plaa et Hewitt, 1998**).

Tableau01.Principales hépatopathies médicamenteuses : Pathogenèse et exemples de cause (Plaa et Hewitt, 1998; Thomson et Shaffer, 2005).

	Domage	Médicament(exemple)	Pathogenèse
Hépatopathies aiguës	1.Lésion hépatocellulaire aiguë - nécrose toxique - stéatose	Acetaminophène Tétracycline	- Domage membranaire -surcharge en graisse dans les hépatocytes
	2. cholestase - inflammation -pure -mixte	Ajmaline Steroïdes anabolisants Sulindac	-jaunisse obstructive, inflammaion périportale et cholestase -jaunisse obstructive -Jaunisse obstructive ou hépatite
Hépatopathieschroniques	Hépatite chronique	Méthyl dopa	-Idiosyncrasie
	Cholestase chronique	Chlorpromazine	- Inconnue, rare
	Stéatose chronique	Asparaginase	-Stéatose alcoolique le plus souvent
	Fibrose/cirrhose	Méthotrexate	-dommages métaboliques toxiques insidieux

Les lésions cholestatiques s'apparentent à une jaunisse obstructive extrahépatique dans leurs manifestations cliniques (ictère, prurit) et leurs paramètres biochimiques (Plaa et Hewitt, 1998).

Par ailleurs, parmi les atteintes hépatiques chroniques, on retrouve principalement les hépatites chroniques actives, les stéatoses, les cholestases, les fibroses, plusieurs formes de cirrhoses, et les néoplasmes (tumeurs) hépatiques (Meeks et al., 1991; Plaa et Hewitt, 1998).

2.1. Surdoses médicamenteuses

Lorsque consommés aux doses recommandées, la plupart des médicaments se montrent inoffensifs pour le foie. Cependant, s'il y a surdosage, ils peuvent alors exercer une action hépatotoxique (**Plaa et Hewitt, 1998**); la surdose s'avère soit aiguë, soit chronique (**Gyamlani et Parikh, 2002**). D'une part, la surdose aiguë se rapporte à l'ingestion unique d'une quantité importante de médicament dépassant largement le seuil de toxicité.

D'autre part, la forme chronique est due à l'usage répété et à long terme de doses thérapeutiques et surtout supra thérapeutiques modérément élevées d'un composé pharmaceutique dans le but, habituellement, d'augmenter l'effet désiré (**Gyamlani et Parikh, 2002**). Toutefois, dans les deux cas, le développement d'une cytolyse hépatique peut aboutir à une nécrose complète se traduisant par une insuffisance hépatique (**Thomson et Shaffer, 2005**).

2.2. Insuffisance hépatique

L'insuffisance hépatique, ou insuffisance hépatocellulaire, se définit comme l'incapacité du foie à remplir ses fonctions (**Thomson et Shaffer, 2005**); elle peut être aiguë ou chronique (**Ostapowicz et al., 2002**). Alors que la forme aiguë se rapporte à la détérioration rapide des fonctions hépatiques chez un individu au foie auparavant normal (le plus souvent par atteinte cytolytique ou infection virale à l'hépatite) (**Larsen et al., 2002; Thomson et Shaffer, 2005**), l'insuffisance hépatocellulaire chronique implique une manifestation plus tardive de l'affectation et est causée par un endommagement progressif du foie causé surtout par une cirrhose (**Ostapowicz et al., 2002; Thomson et Shaffer, 2005; Seiler et al., 2006**). De plus, les insuffisances hépatocellulaires aiguë et chronique s'avèrent associées à une morbidité et une mortalité élevées (**Rahman et Hodgson, 1999**).

3. Induction enzymatique et production des métabolites toxiques des médicaments

Le foie constitue le principal site de la biotransformation des xénobiotiques pénétrant intentionnellement (médicaments, produits de l'alimentation) ou non intentionnellement (ex: polluants environnementaux) dans l'organisme, et ce processus se déroule spécifiquement dans les hépatocytes (**Meeks et al., 1991; Berry et Edwards, 2000**). Certains xénobiotiques peuvent traverser la bicouche lipidique des cellules, et leur biotransformation a pour principale conséquence la formation de métabolites qui sont ensuite retirés du corps (**Berry et Edwards, 2000**). Étant donné la variabilité importante de la nature chimique des xénobiotiques, de nombreuses enzymes et isoenzymes se montrent nécessaires pour leur

métabolisme; il s'agit des enzymes du métabolisme et du transport des xénobiotiques (EMTX), réparties en différentes phases (**Meeks et al., 1991; Ortiz de Montellano, 1995**).

Habituellement, il y a premièrement transport du xénobiotique du sang vers l'intérieur de la cellule, puis la substance est tout d'abord oxydée, mais aussi parfois réduite ou hydrolysée, principalement par le système enzymatique monooxygénase du cytochrome P450 (métabolisme de phase 1); elle est ensuite conjuguée à des molécules hautement polaires par le glutathion, la cystéine et le sulfate (métabolisme de phase 2). Les métabolites, devenus hydrosolubles, sont ensuite transportés à l'aide de protéines de transport directement vers les canalicules biliaires puis excrétés dans la bile, où sont à nouveau libérés dans le système sanguin et excrétés dans l'urine via les reins. De plus, le métabolisme de la phase 3 correspond au transport intracellulaire des xénobiotiques (**Jacquemin, 1998; Berry et Edwards, 2000; Petzinger et Geyer, 2006**).

4. Paracétamol et hépatite

Le mécanisme de l'hépatotoxicité du paracétamol a été analysé chez l'homme. La toxicocinétique d'un médicament diffère de sa pharmacocinétique. Le paracétamol est largement converti en glucuro- et sulfoconjugués non toxiques puis excrétés dans les urines. Une petite quantité de paracétamol est métabolisée par les cytochromes P450 en produit intermédiaire toxique, la N-acétyl-p-benzoquinone imine. Ce métabolite intermédiaire fortement électrophile est rapidement inactivé par conjugaison avec le glutathion réduit par le glutathion s-transférase. (**Bismuth C, 1998**). Lors d'un surdosage, les niveaux de glutathion sont faibles car surconsommés et la voie est saturée par de fortes doses de paracétamol. L'intermédiaire réactif, le NAPQI s'accumule et se lie aux protéines cellulaires hépatiques conduisant à des lésions cellulaires provoquant l'apoptose, et aboutissant à une nécrose hépatocytaire centrolobulaire (**Megarbane B., Deye N., Baud F, 2007**). D'autres mécanismes, souvent associés, sont à l'origine de la toxicité hépatique (**Bismuth C, 1998**). En effet, la forte présence de NAPQI provoque la dégradation des lipides membranaires à l'origine d'altérations de la membrane des hépatocytes. Ces derniers perturbent également l'homéostasie calcique responsable de l'activation d'enzymes cytolytiques.. Les facteurs qui augmentent le métabolisme du paracétamol par le système du cytochrome P450 (certains médicaments, l'éthylisme chronique) ou qui diminuent la disponibilité du glutathion (jeûne, malnutrition) peuvent prédisposer à la toxicité du paracétamol. Les facteurs qui influent sur la toxicité en aval des intermédiaires métaboliques du paracétamol peuvent aussi influencer sur la

toxicité. Ces facteurs sont importants dans la conception de la thérapie pour l'hépatotoxicité du paracétamol (Megarbane B., Deye N., Baud F , 2007)

5. Stress oxydant induit par les médicaments

La biotransformation des médicaments s'accompagne dans la plus part des cas de la génération des radicaux libres et dans certains cas le médicament est lui-même sous forme radicalaire, ce qui provoque une diminution de la défense anti oxydante conduisant à un stress oxydant.

6. Stress oxydant

6.1. Définition de stress oxydatif

Le stress oxydant apparait dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces pro-oxydantes et anti-oxydantes est rompu en faveur de l'état pro-oxydant (Sies, 1991). ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation. Un stress oxydatif peut donc se développer suite à une surproduction des oxydants comme les espèces activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants (Sergent et al., 2000).

6.2. Espèces réactives oxydantes (ERO)

6.2.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique qui a la particularité de porter un électron célibataire (ou non apparié) sur sa couche externe, cet état lui confère une instabilité énergétique et cinétique qui le rend généralement capable de réagir avec d'autres molécules chimiques environnantes (Asmus et al, 2000).

Les Espèces Réactives Oxygénées (ERO) sont des molécules contenant de l'oxygène, mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule de dioxygène(O_2). Les ERO comprennent des radicaux tels le superoxyde (O°), l'hydroxyle (OH°), l'oxyde nitrique (NO°), et des espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène HO_2 , l'oxygène singulet (1O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^-$). Le superoxyde et l'hydroxyle sont très instables, au contraire d' H_2O , qui diffuse librement et a une durée de vie plus longue. (Morel et Barouki, 1999).

Tableau03. Les principales espèces réactives (Poisson, 2013)

Espèces Radicalaires	Espèces non Radicalaires
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	oxygène singulet ($1O^2$)
Radical hydroxyle ($\cdot OH$)	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
Monoxyde d'azote (NO^{\cdot})	Le peroxydinitrite (NO_3^{\cdot})
Grande instabilité : Stabilisation par réaction avec les constituants cellulaires	Eléments de décomposition pour la détoxification par les systèmes

6.2.2. Formation des espèces réactives oxydantes (ERO)

6.2.2.1. ERO radicalaires

a – L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

C'est l'une des premières ERO à être formées, l'espèce la plus couramment générée par la cellule ; l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) peut provenir de plusieurs sources cellulaires. Il est formé après réduction d'une molécule d' O_2 par un électron et en présence d'un cofacteur NADPH. Les différentes enzymes permettant cette réaction sont : la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclo-oxygénases ou COX, les lipo-oxygénases, les oxyde nitrique synthases NOS (Nitric Oxyde Synthases), les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) et celles de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie (Cai et Harrison, 2000).

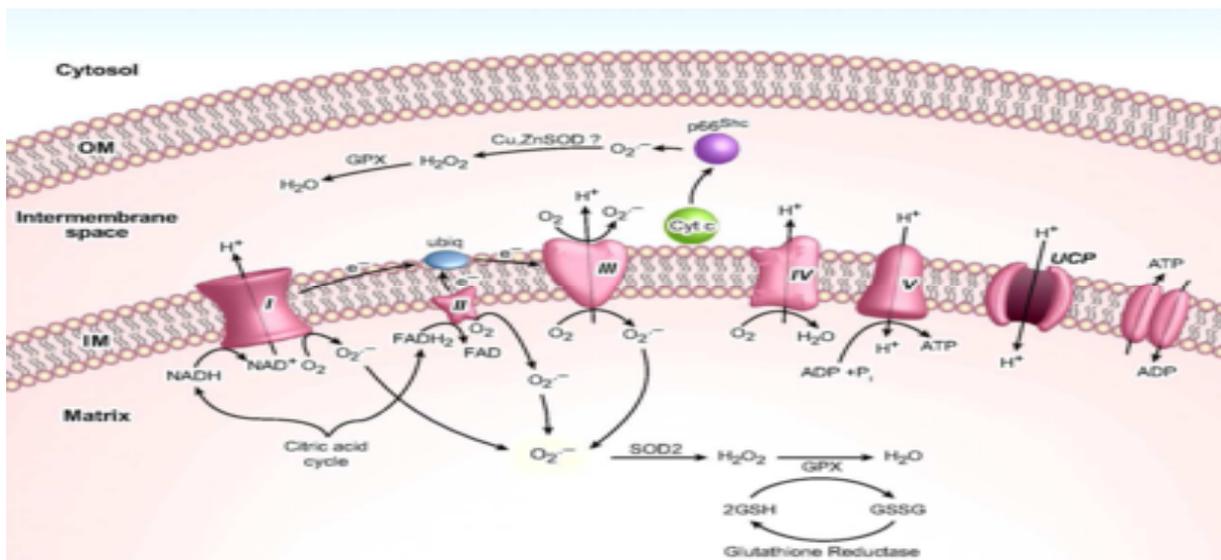


Figure 01. Production de super oxyde par la phosphorylation oxydative mitochondriale (Nageswara *et al*, 2007).

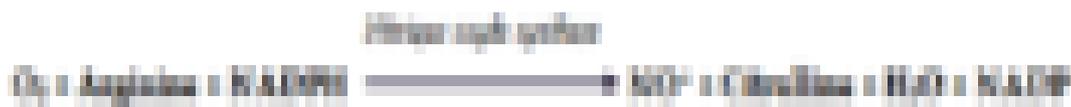
b - Le radical hydroxyle (HO[•])

Le radical hydroxyle (OH[•]) apparaît comme l'espèce réactive ayant une responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (**Guetteridge, 1993**). Parmi les voies conduisant à la formation de ce radical, on peut citer celle qui implique les métaux de transition, le cuivre et le fer sous leurs formes réduites par une réaction appelée réaction de Fenton (**Favier, 2003**).



c - L'oxyde nitrique (NO[•])

L'oxyde nitrique est un gaz qui ainsi diffuse bien à travers les membranes. Il est synthétisé par l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS) à partir de l'O₂ et l'acide aminé arginine. (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).



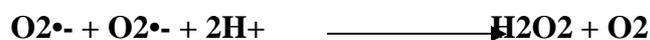
6.2.2.2. ERO non radicalaires

a - L'oxygène singulet (1O₂)

L'oxygène singulet (1O₂) correspond à une forme excitée de l'oxygène O₂, il possède la même structure électronique que l'oxygène mais « agencée » différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état « excité » lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).

b - Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est une molécule stable, mais diffusible et avec une durée de vie compatible avec une action à distance de son lieu de production. Il est généré dans le peroxysoxe, les microsomes et les mitochondries par une réaction de dismutation (**Ramirez et al., 2008**).



c - Le peroxydite (NO_3^-)

Son apparition est extrêmement rapide, NO_3^- est une ERO qui cause beaucoup de dommages aux composants cellulaires (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).



6.3. Atteintes cellulaires

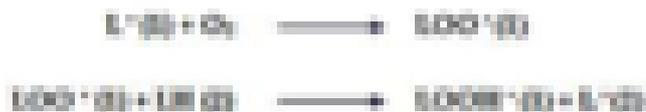
6.3.1. Peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les cibles privilégiées des ERO radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables. Plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être peroxydé, c'est-à-dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique. Le mécanisme radicalaire comporte trois étapes successives : **l'initiation, la propagation et la terminaison (Halliwell et Gutteridge, 1989)**.

. **L'initiation** : l'acide gras polyinsaturé est attaqué par un radical hydroxyle (OH^\bullet), ce dernier est capable d'arracher l'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, position particulièrement fragile pour donner un radical lipidique (R^\bullet). Par réarrangement des doubles liaisons, il se forme un diène conjugué. Cette molécule réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde (ROO^\bullet).



. **Propagation** : le radical lipidique R^\bullet subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical avec une structure de diène conjugué, plus stable. La propagation est réalisée par la fixation d'une molécule d' O_2 et formation d'un radical peroxyde (ROO^\bullet) (**Esterbauer et al., 1992**). Ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un hydrogène à un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction. L'hydroperoxyde lipidique (ROOH) formé peut être oxydé en présence de métaux de transition divalents Fe^{2+} ou Cu^{2+} et entraîner la formation d'alcalines et d'aldéhydes toxiques (**kohen et nyska, 2002**).



. **Terminaison** : la réaction en chaîne peut être interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (**Delattre et al., 2005**).

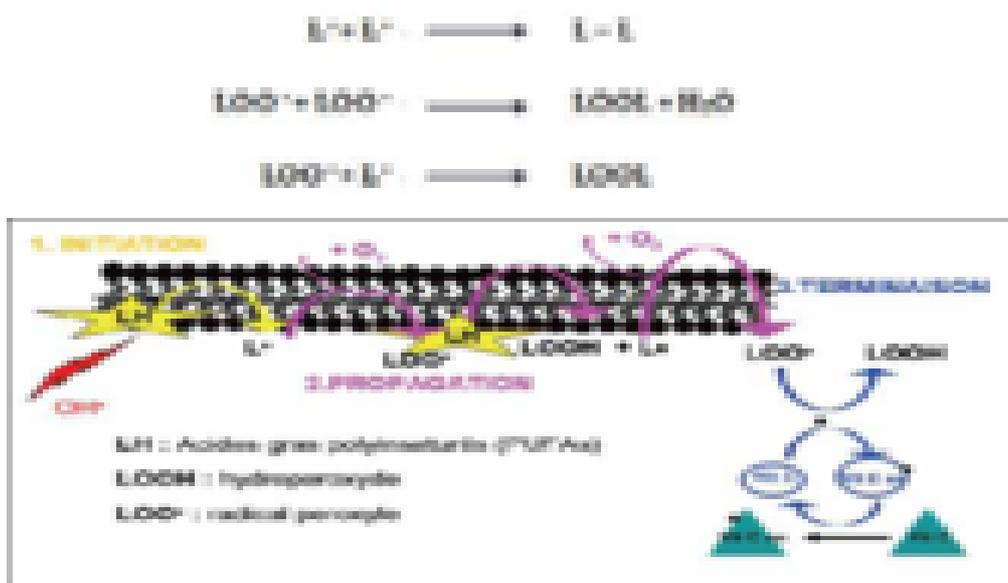


Figure 02 . Réactions de la peroxydation lipidique (Niedernhofer *et al.*, 2003).

La peroxydation lipidique fournit ainsi une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéanal (4-HNE) ont été étudiés comme marqueur de la peroxydation lipidique (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

6.3.2. Oxydation des protéines

A cause de leur abondance dans l'organisme, les protéines sont une cible importante des ERO.

Les modifications oxydatives des protéines provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine (formation de protéines carbonylées « PC ») (Levine, 2002). Ces réactions d'oxydation sont fréquemment influencées par les métaux de transition (Bloomer *et al.*, 2004). Elles peuvent être classées en deux catégories : d'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne peptidique, et d'autre part, les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE (Levine, 2002). Il s'ensuit plusieurs types de modifications : fragmentation de la protéine, oxydation des chaînes latérales des acides aminés et formation de liaisons croisées entre deux protéines (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2001). Ces modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002) et deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées. L'oxydation de la cystéine est réversible mais peut également perturber les fonctions biologiques du glutathion (GSH) ou de certaines protéines. Le rôle des protéines dans la

cellule est tel que leur ; dysfonctionnement peut bouleverser le fonctionnement cellulaire (enzymes et protéines structurales) (Delattre *et al.*, 2005).

6.3.3 Oxydation des glucides

Si la chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les espèces réactives de l'oxygène attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycane du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques et en présence de traces métalliques, en libérant des cetoaldehydes, H_2O_2 et OH^\bullet , qui entraineront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cetoaldehyde, formant un produit de glycation avancée ou AGE (Advanced Glycation End products). Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

6.4. Les systèmes de défenses antioxydants

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell, 1990). Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (Delattre *et al.*, 2005).

6.4.1. Superoxyde dismutases (SOD)

sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène (Zelko *et al.*, 2002).

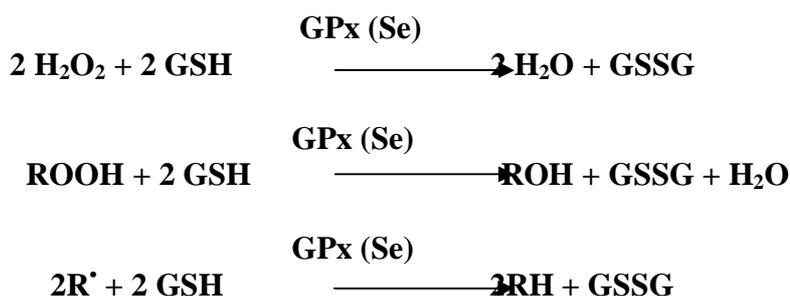


La superoxyde dismutase existe sous plusieurs isoformes, forme d'un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, des superoxydes dismutases à cuivre-zinc (cCu-ZnSOD) protégeant le cytosol, la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD) (Zelko *et al.*, 2002 ; Favier, 2006).

6.4.2. Les glutathions peroxydases (GPx)

Les glutathions peroxydases présentes dans la plupart des tissus de mammifères, sont des enzymes formées de quatre sous unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélélocystéine. Elles catalysent la réduction par le glutathion réduit (GSH) du peroxyde d'hydrogène en eau et de divers hydroperoxydes lipidiques produits (ROOH) en alcools et des espèces radicalaires en espèces non radicalaires.

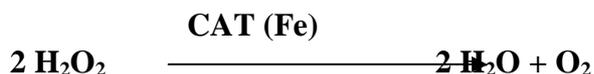
Les réactions mises en jeu sont les suivantes (**Reichel, 2010**).



6.4.3. Catalases

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissu mais sont particulièrement abondantes dans les globules rouges et les peroxysomes hépatiques.

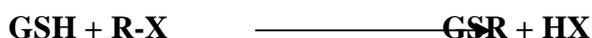
Les catalases catabolisent les peroxydes d'hydrogènes en eau et en oxygène moléculaire (**Mates et al., 1999**).



6.4.4. Glutathionne-S-transférase

Glutathion S-transférase est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes (**Renuka et al., 2003**). La glutathion-S-transférases (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (**Zhuhua et al., 2004**).

L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit:



6.5. Antioxydants non enzymatiques

Ce groupe d'antioxydants est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les EOR comme les vitamines C et E, les polyphénols,...etc (**Leverve., 2009**).

6.5.1. Vitamine E

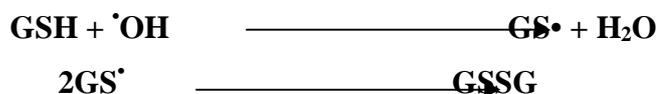
La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols (α , β , δ , γ). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. Seuls α et δ tocophérols possèdent les propriétés antioxydants les plus intéressantes. (**Vertuani et al., 2004**).

6.5.2. Vitamine C (acide ascorbique)

C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires. La vit C peut directement réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme HO^\bullet ou O_2^\bullet (et leur forme protonée HO_2^\bullet), ce qui est tout à fait remarquable puisque ces derniers sont connus pour être très peu réactifs. (**Gardes-Albert et al., 2003**).

6.5.3. Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion est un tripeptide (L-- γ -glutamy-L-cysteinyl-glycine) (**Li et al.;2005**), joue un rôle important comme antioxydant endogène et dans le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction. En fait, le GSH participe à l'élimination du H_2O_2 et des LOOH, en servant de cosubstrat à l'enzyme GSH-Px (**Ferrari et al. ;1991**). Le GSSG formé par cette première réaction est à nouveau réduit en GSH par la GSH réductase, une enzyme qui utilise le NADPH comme cofacteur. Le GSH peut inhiber la peroxydation des lipides et s'avère efficace comme piègeur direct de certains ERO. Tels les radicaux OH^\bullet et l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ (**Halliwell. ;1996**). Il est antioxydant par son caractère nucléophile et radicalaire :



I. Prélèvements des échantillons :

1. Prélèvement sanguin :

Le sang est immédiatement recueilli dans des tubes polyéthylènes étiquetés contenant l'anticoagulant EDTA.

Ces tubes vont subir une centrifugation 3000 tours/min pendant 15 min, puis on récupère le plasma résultant. Les échantillons obtenus ont été stockés au congélateur, à -20°C pour le dosage ultérieur des paramètres biochimiques (glycémie, urée, créatinine, bilirubine total et directe, phosphatase alcaline, transaminases, protéines totaux, albumine et cholestérol).

2. Techniques de dosage :

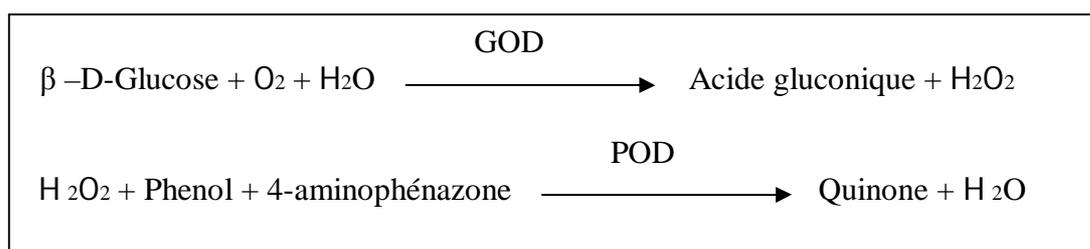
2.1. Dosage des paramètres biochimiques :

2.1.1. Dosage du glucose sanguin :

La détermination de la glycémie a été réalisée par la méthode enzymatique au glucose oxydase (selon la fiche technique Spinreact).

- Principe :

Le glucose est transformé par la glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge-violet (quinoneimine) (Kaplan, 1984), selon les réactions suivantes :



- Réactifs :

Réactif 1 : Tampon	glucose oxydase, peroxydase UA.A.P
Réactif 2	Phenol
Réactif 3 : Etalon	concentration 1g /l de glucose
Réactif de travail	verser 500 ml de R1 dans R2

- Mode opératoire :

	Blanc	Étalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1000	1000	1000
Étalon (ml)	--	10	--
Echantillon (ml)	--	--	10

Bien agiter et incuber les tubes pendant (minute à 37°C) lire la densité optique (DO) de l'étalon et de l'échantillon à $\lambda=500$ nm contre le blanc- réactif. et attendre 30mn pour mesurer la D.O à 505nm.

- Calcul de la concentration :

La concentration du glucose est calculée par la formule suivante :

$$[\text{glucose}] \text{ g/l} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO d'étalon}} \times \text{concentration de l'étalon}$$

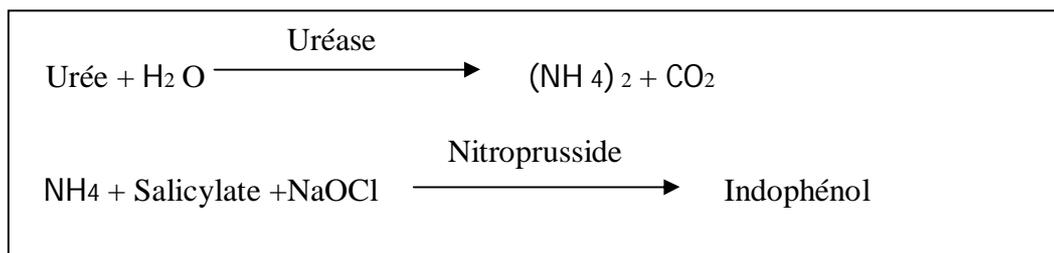
-Les normes: 0,70 g/l -1,10 g/l.

2.1.2. Dosage de l'urée sérique :

Le dosage est réalisé sur le sérum par la méthode colorimétrique utilisant l'urease selon la fiche technique Spinréact.

- Principe :

L'urease hydrolyse l'uree en ammoniacque (NH₄) et le dioxyde de carbone (CO₂). Les ions reagissent avec le salicylate et l'hypochlorite (NaClO), en presence de nitroprusside pour former l'indophenol de couleur verte (**Kaplan et al, 1984**), selon les réactions :



- Réactifs :

Réactif 1 : Tampon	(R1) salicylate de Na + (R2) solution d'uréase.
Réactif 3 :	standard (0,5 g/l).
Réactif 4 :	hypochlorites de Na+NaOH + l'eau distillée.

- Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1	1	1
Etalon (ml)	--	10	--
Echantillon (ml)	--	--	10

Mélanger et incuber à 37°C pendant 5 min. puis ajouter 1ml de réactif (R4) pour chaque tube. Mélanger, incuber à 37°C pendant 5 min et lire la DO à $\lambda = 600$ nm.

- Calcul de la concentration :

La concentration du glucose est calculée par la formule suivante :

$$[\text{Urée}] = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (0.5g/l)}$$

2.1.3. Dosage de la créatinine sérique:**- Principe :**

la créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe colore, mesure dans un intervalle de temps défini et proportionnel a la concentration en créatinine de l'échantillon (sérum) (Murray, 1984a).

- Réactifs :

Réactif 1 :	Acide picrique 17.5 mmol/L.
Réactif 2 :	Hydroxyde de sodium 0.29mol/L.
créatinine calibrant:	Créatinine aqueux (standard) 2 mg/dL.

➤ **Réactif de travail :** mélanger un volume de réactif 1 avec un volume de réactif 2.

- Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (μ l)	--	100	--
Echantillon (μ l)	--	--	100

Mélanger, déclencher le chronomètre. Lire à 492 nm la densité optique (DO1) après 30 secondes et la densité optique (DO2) après 90 secondes.

- Calcul de la concentration :

La concentration de la créatinine est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{ DO échantillon} - \Delta \text{ DO blanc}}{\Delta \text{ DO étalon} - \Delta \text{ DO blanc}} \times \text{concentration de l'étalon (2 mg/dL)}$$

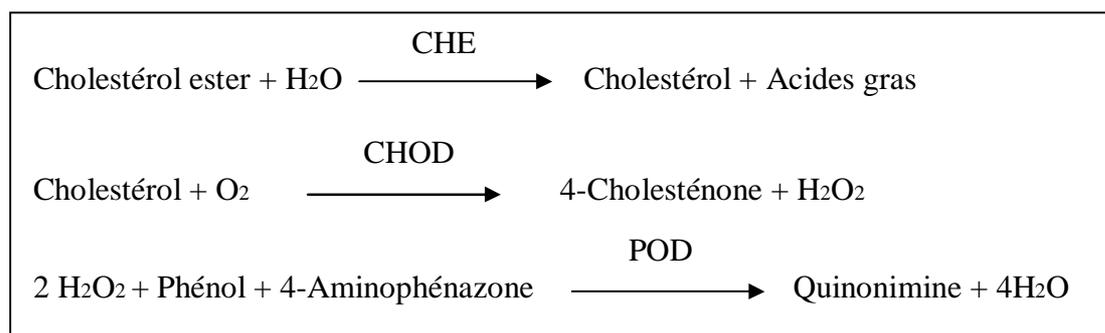
$$\Delta \text{ DO} = (\text{DO 2} - \text{DO 1})$$

2.1.4. Dosage du cholestérol plasmatique

Nous avons utilisé des coffrets (Spinreact) pour réaliser ce dosage.

- Principe

Le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré (Naito, 1984), selon les réactions ci-dessous :

**- Réactifs**

Réactif 1 : Tampon	90 mmol/L PIPES pH 6.9 + 26 mmol/L Phénol
Réactif 2 : Enzymes	300 U/L Cholestérol estérase (CHE) + 300 U/L Cholestérol oxydase (CHOD) + 1250 U/L Peroxydase (POD) + 0.4 mmol/L 4-Aminophénazone (4-AP)

Cholestérol calibrant:	200 mg/dL Cholestérol aqueux (standard)
-------------------------------	---

➤ **Réactif du travail** : dissoudre le contenu de (réactif 2) dans un flacon de (réactif 1).

- Mode opératoire

	Blanc	Tampon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Tampon (μ l)	--	10	--
Echantillon (μ l)	--	--	10

Mélanger et incuber pendant 10 min à la température ambiante. Lire l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon à 505 nm contre le blanc.

- Calcul de la concentration

La concentration du cholestérol est calculée par la formule suivante :

$$\text{Cholestérol (mg/dL)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 200$$

2.1.5. Dosage de la bilirubine totale et directe :

La détermination de la bilirubine a été réalisée par la méthode colorimétrique (selon la fiche technique Spinreact).

- Principe :

La bilirubine réagit avec l'acide sulfanilique diazote a pH acide pour produire l'azobilirubine.

Cette réaction est instantanée avec la bilirubine directe (la bilirubine conjuguée), par contre avec la bilirubine totale (bilirubine non conjuguée) elle est indirecte nécessite la solubilisation par le diméthylsulfoxyde (DMSO). (En absence de DMSO, seule la bilirubine directe réagit). L'intensité de la coloration est proportionnelle a la concentration de la bilirubine dans l'échantillon (**Malloy et al., 1937 ; Kaplan et al., 1984**).

- Réactifs :

Réactif 1 (BD) :	30mmol/l d'acide sulfanilique + 150 mmol/l d'acide hydrochlorique.
Réactif 2 (BT) :	30mmol/l d'acide sulfanilique + 150 mmol/l d'acide hydrochlorique + 7mmol/l DMSO.
Réactif 3 :	29 mmol/l de nitrite de sodium.

- Mode opératoire :

	Blanc	BT ou BD
Réactif 1 : BT (ml)	1.5	1.5
Réactif 2 : BD (ml)	1.5	1.5
Réactif 3 : (μ l)	--	50
Echantillon : (μ l)	100	100

Mélanger et lire la densité optique après 5 minutes d'incubation à une longueur d'onde $\lambda=555$ nm.

- Calcul de la concentration :

La concentration de la bilirubine est calculée par la formule suivante :

$$\text{Bilirubine directe} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO blanc échantillon}}{\text{DO calibrant} - \text{DO blanc calibrant}} \times \text{concentration de calibrant}$$

2.1.6. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) plasmatique :**- Principe :**

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate à pH 10.4 pour donner le p-nitrophénol et le phosphate (Wenger et *al.*, 1984 ; Rosalki et *al.*, 1993), selon la réaction suivante :



- Réactifs :

Réactif 1 : Tampon	1mmol/L Diéthanolamine (DEA) pH 10.4 + 0.5mmol/L Chlorure de magnésium
Réactif 2 : Substrat	10mmol/L p-Nitrophénylphosphate (pNPP)

➤ *Réactif de travail* : dissoudre une tablette de (réactif 2) dans une bouteille du (réactif 1).

- Mode opératoire :

Réactif de travail (ml)	1.2
Echantillon (μl)	20

Mélanger, incuber pendant une minute. Lire à 405 nm l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes (Δ abs/min) pour l'utiliser dans les calculs.

- Calcul de la concentration :

Pour estimer l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline, on utilise la formule suivante :

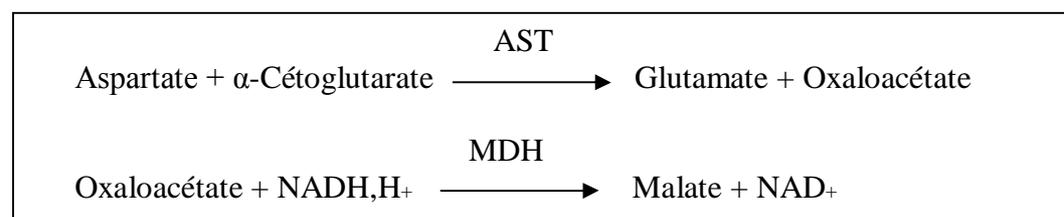
$$\text{Phosphatase alcaline (U/L)} = \Delta \text{ DO/min} \times 3300$$

2.1.7. Dosage des transaminases plasmatiques :**a - Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) :**

Nous avons utilisé des coffrets (Spinreact) pour réaliser ce dosage.

- Principe

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH,H⁺ (Murray, 1984) selon la réaction :



- Réactifs

Réactif 1 : Tampon	80 mmol/l Tris pH 7.8 + 200 mmol/l L- Aspartate
Réactif 2 : Substrat	0.18 mmol/l NADH + 800 U/L Lactate déshydrogénase (LDH) + 600 U/L Malate déshydrogénase (MDH) + 12 mmol/l α -Cétoglutarate

➤ **Réactif de travail** : Dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

- Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (μl)	100

Mélanger, incuber pendant une minute. Lire à 340 l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes.

- Calcul de la concentration

La concentration d'aspartate aminotransférase calculée par la formule suivante :

$$\text{ASAT (U/L)} = \Delta\text{DO}/\text{min} \times 1750$$

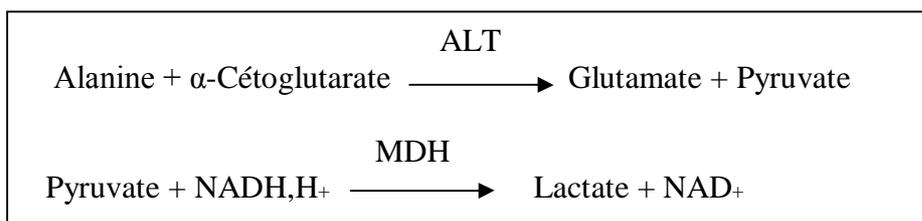
b - Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT)

Nous avons utilisé des coffrets (Spinreact) pour réaliser ce dosage.

- Principe

L'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi le pyruvate de glutamate transaminase (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H⁺ (Murray, 1984).

Ce principe est présenté selon la réaction suivante :



- Réactifs

Réactif 1 : Tampon	100 mmol/l Tris pH 7.8 + 500 mmol/l L- Alanine
Réactif 2 : Substrat	0.18 mmol/l NADH + 1200 U/L Lactate déshydrogénase (LDH) + 15 mmol/l α -Cétoglutarate

➤ **Réactif de travail** : Dissoudre le contenant du R2 dans le flacon de R1. Ce réactif est stable 2 semaines à 2-8°C.

- Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (μl)	100

Mélanger, incubé pendant une minute à température ambiante et lire l'absorbance initiale à 340 nm. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes (Δ Abs/min) pour l'utiliser dans les calculs.

- Calcul de la concentration

La concentration d'alanine aminotransférase est calculée par la formule suivante :

$$\text{ALAT (U/L)} = \Delta \text{DO/min} \times 1750$$

2.1.8. Dosage des protéines totales plasmatiques

Le dosage de protéine a été réalisé par la méthode colorimétrique (selon la fiche technique Spinreact).

- Principe

Les protéines forment un complexe coloré en bleu violet intensif avec les ions de cuivre dans un milieu alcalin. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des protéines totales dans l'échantillon (Koller, 1984 ; Burtis et *al.*, 1999).

- Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (μl)	--	25	--
Echantillon (μl)	--	--	25

Mixer et incuber 5 min à 37 °C ou 10 min à la température ambiante (15-25°C). Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 540 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

- Calcul de la concentration

La concentration des protéines totales est calculée par la formule suivante :

$$\text{Protéines totales (g/dL)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (7 g/dL)}$$

2.1.9. Dosage d'albumine

La détermination de la concentration de l'albumine a été réalisée par la méthode colorimétrique.

-Principe

L'albumine réagit avec le vert de bromocrésol (BCG), pour former un complexe coloré. Le pH du milieu est maintenu à 4.2 par le tampon. Après l'incubation, l'absorbance du mélange est mesurée à 628 nm (Doimas, 1971).

- Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	5	5	5
Etalon (μ l)	--	20	--
Echantillon (μ l)	--	--	20

Mélanger, incuber pendant 5 min à 37°C. Lire les densités optiques contre le blanc à 628 nm.

-Calcul de la concentration

La concentration d'albumine est calculée par la formule suivante :

$$\text{Albumine (g/L)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (50 g/L)}$$

Discussion

L'hépatotoxicité induite par les médicaments constitue un problème majeur de santé (**Keeffe, 2005**). Les médicaments pouvant endommager le foie sont habituellement catégorisés comme des agents hépatotoxiques intrinsèques, ou des composés idiosyncrasiques, selon que la toxicité provoquée s'avère respectivement prévisible ou imprévisible (**Meeks et al., 1991**).

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme (**Simeonova et al, 2004**). La production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) en faible concentration est absolument nécessaire pour certains processus physiologiques tels que la différenciation et la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'immunité à médiation cellulaire, mais les ROS jouent aussi un rôle dans la pathogenèse de différentes maladies (**Simeonova et al, 2004**).

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non enzymatiques (**Garait, 2006**).

Malheureusement la biotransformation des médicaments dans certains cas conduit à un état de stress oxydant. C'est pour cela notre objectif de travail est d'évaluer le statut antioxydant chez les sujets atteints d'une insuffisance hépatique.

Paramètres biochimiques

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative de la glycémie (48.05%) chez les insuffisants hépatiques par rapport aux témoins. Cette hyperglycémie est probablement due aux effets du stress oxydant. En effet, le stress oxydatif est responsable d'une multitude de dysfonctions métaboliques comme la résistance à l'insuline (**Santure et al., 2002**). L'état de résistance à l'insuline est caractérisé par la diminution de la réponse à l'insuline dans les cellules insulinosensibles. L'insulino-résistance entraîne une élévation des taux circulants d'insuline et une intolérance au glucose et une diminution de la stimulation du captage du glucose par l'insuline. Ce qui inhibe la pénétration du glucose dans les cellules (**Baudler et al., 2003**).

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative de la concentration sérique de cholestérol(57.85 %) chez les insuffisants hépatiques par rapport aux témoins ce qui confirme l'insuffisance hépatique. Ces résultats sont en accord avec les d'autres études (**Bansal et al, 2005; Lehr et al, 1999**).

Une diminution importante des protéines totales (56.90 %) et d'albumine plasmatiques (51.58 %) chez les insuffisants hépatique par rapport aux témoins peut être expliquée par le fait que la plupart des protéines possèdent des groupements (SH, OH) ces dernières réagissent très facilement avec les radicaux libres générés et par conséquence ces protéines peuvent se dénaturer et se fragmenter, ou perdre leurs structures primaires et secondaires (**Aposhian et Aposhian, 1989**). Donc, la réduction des protéines plasmatiques chez les insuffisants hépatiques pourrait être attribuée à la modification de la synthèse des protéines et le métabolisme des acides aminés au niveau du foie (**El-Demerdash et al., 2009**).

Une augmentation très hautement significative de l'activité enzymatique des transaminases ; (ASAT (32.53%), ALAT (30.29%)), de la phosphatase alcaline (PAL)(35.26%) chez les patients insuffisants hépatiques par rapport aux témoins, ce qui en accord avec les travaux de ;(**Klaassen et Watkin, 1984 ; Ronald et Koretz, 1992**), cette augmentation est liée à l'effet hépatotoxique des médicaments(**Liu et al.,2000**), où l'accumulation des métabolites toxiques de la peroxydation lipidique (MAD, 4-HNE) provoque une lésion des cellules hépatiques qui déversent leurs contenu tels que les transaminases et la phosphatase alcaline dans le sang(**Youssef et al., 2008**).

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative de la bilirubine totale (25.70 %) et directe (12.42 %) chez les insuffisants hépatiques par rapport aux témoins. On peut expliquer cette augmentation par la présence d'une lésion hépatique qui est un indicateur de la présence d'une hyperbilirubinémie est clairement démontré par les recherches réalisée par **Leelavinothan and Kasinathan, 2011**.

Par contre l'étude la fonction rénale ne montrent aucune différence significative de la concentration sérique de l'urée et de la créatinine chez les insuffisants hépatiques par rapport aux témoins ce qui est confirmé par les travaux de **Prasad et al, 1995, Novelli et al, 1998**. D'après les travaux de **Hfaïedh et al, 2005**, l'insuffisance hépatique n' induit pas un dysfonctionnement tubulaire ou une néphropathie tubulo-interstitielle.

Paramètres du stress oxydant

L'étude des paramètres du stress oxydant plasmatique montre une diminution très hautement significative du taux de glutathion réduit (GSH) (14.44 %) chez les insuffisants hépatiques comparés aux témoins, ce résultat a été confirmé par **Vadde & Rama, 2008 ; Venkateswaran & Pari, 2002 ; Murat *et al.*, 2004 ; Nahla *et al.*, 2006 ; Meral *et al.*, 2004**. Ce résultat peut être expliqué par l'hyperglycémie, dans ces conditions le glucose est utilisé par la voie des polyols et se transforme en sorbitol, cette réaction consomme le NADPH, ce dernier est indispensable pour la régénération de glutathion par l'enzyme glutathion réductase ce qui explique la diminution de la glutathion chez les insuffisants hépatiques (**West, 2000 ; Baynes, 1991**). De plus le taux de GSH est diminué en raison du taux élevé des ions superoxydes et les radicaux libres le GSH est convertit en GSSG (glutathion oxydé) (**Loven *et al.*, 1986 ; Bedwal, 1983**).

Les enzymes antioxydantes sont considérées comme la première ligne de défense de l'organisme contre les radicaux libres, d'où elles préviennent l'oxydation des macromolécules biologiques. Au cours de notre étude nous avons enregistré une diminution très hautement significative de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) (46.86 %) dans le plasma chez les insuffisants hépatiques par rapport aux témoins (**Soudani *et al.*, 2010**). Le maintien de l'activité des enzymes anti-oxydantes est lié à la production de NADPH qui est le principal réducteur cellulaire exemple : le NADPH est un cofacteur de la catalase et l'activité de cette enzyme dépend de ce cofacteur (**Gaetani *et al.*, 1994 ; Kirkman & Gaetani, 1984 ; Kirkman *et al.*, 1999**), aussi le NADPH sert de cofacteur de la glutathion réductase qui catalyse la réduction de la forme oxydée de glutathion (GSSG), ce glutathion réduit (GSH) est le majeur piègeant des radicaux libres. La majeure source de NADPH est la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) qui catalyse la 1ère réaction de la voie des pentoses phosphate (**Pandolfi *et al.*, 1995**). Notre étude a montré une diminution très hautement significatives de l'activité enzymatique de la GPx chez les insuffisants hépatiques.

Concernant la glutathion-S-transférase (GST), cette enzyme joue un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et/ou dans la protection contre des métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (**Mulder *et al.*, 1999**). D'après nos résultats on observe une augmentation très hautement significative de la GST (71.25 %) dans le plasma chez les insuffisants hépatiques.

L'augmentation de l'activité de cette enzyme est une réponse physiologique pour compenser les altérations qui sont dus aux radicaux libres (Nuriye & Belma, 2005). donc la GST est impliquée dans l'élimination des radicaux libres générés au cours de l'insuffisance hépatique. (Xu *et al.*, 2002).

Du fait de la difficulté de la mesure des radicaux libres, des marqueurs indirects sont déterminés. Ces marqueurs sont les produits secondaires de la peroxydation lipidique. Il s'agit de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Le dosage de TBA est facile à mettre en œuvre, mais manque de spécificité (Lefevre *et al.*, 1998). Au cours de notre travail nous avons enregistré une augmentation très hautement significative du taux de MDA dans le plasma (70.87 %), chez les insuffisants hépatiques comparées aux témoins. Ce résultat est en accord avec autres études (Durdi *et al.*, 2005 ; vadde & Rama, 2008).

Conclusion et perspectives

Le métabolisme d'un médicament correspond à la transformation par une réaction enzymatique d'un médicament ou plusieurs composés, dits métabolites qui peuvent être actifs ou inactifs pharmacologiquement, ou parfois toxiques.

Mais Malheureusement cette biotransformation des médicaments dans certains cas conduit à un état de stress oxydant.

Le stress oxydant et ses effets sur les cellules de l'organisme est responsable de l'induction de plusieurs maladies et peut entraîner des lésions graves, à cause de la génération des radicaux libres et la peroxydation lipidique.

Notre travail révèle un déséquilibre de statut oxydant/antioxydant au cours de l'insuffisance hépatique médicamenteuse. Celui-ci est marqué :

- En se qui concerne le bilan rénal (urée, créatinine), l'insuffisance hépatique médicamenteuse à rétabli les valeurs a la normal, et se manifeste par une urémie et créatininémie normales. ce qui traduit que l'effet de l'hépatotoxicité est seulement sur la fonction hépatique.
- L'effet du l'insuffisance hépatique médicamenteuse sur la fonction hépatique se traduit par une perturbation très hautement significative des paramètres de la fonction hépatique : TGO, TGP, PAL et le bilirubine totale et directe, protéines totaux et l'albumine.
- Concernant le système de défense antioxydante (diminution de la concentration de GSH plasmatique, et de l'activité enzymatique de GPx). Et une augmentation de la peroxydation lipidique (augmentation de concentration de MDA, et par l'augmentation de l'activité enzymatique de GST plasmatique).

En perspectives, il serait intéressant de cette recherche des marqueurs de stress oxydant sur :

- Les érythrocytaires
- Les deux paramètres de stress oxydant (SOD, catalase)