



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

**Spécialité : PHARMACOTOXICOLOGIE**

THÈME

*Effet protecteur du curcuma longa contre le stress oxydatif induit par une intoxication chronique du paracétamol (étude expérimentale chez les souris swiss)*

Présenté par

Chouachi Moussa

DEVANT LE JURY

Présidente BOUABDELI.F

MCB. U. Mostaganem

Encadreur DOUICHEN.S

MCB. U. Mostaganem

Examineur BAKOURI.H

MAA. U. Mostaganem

*Soutenue publiquement le 02 / 07 /2018*

*Année : 2017/2018*

# *Remerciements*

*En premier lieu, je tiens à remercier notre Dieu, qui m'a donné la force pour accomplir ce travail.*

*Je remercie mes chères parents qui me soutiennent et m'encouragent*

*J'adresse mes vifs remerciements à mon promoteur consultant, Dr DOUICHEN. S pour m'avoir dirigé tout au long de ce travail, et pour ses explications, remarques judicieuses et conseils qui m'ont été précieux pour la réalisation de ce travail.*

*Je présente mes chaleureux remerciements aux membres de jury Dr BAKOURI.H et Dr BOUABDELIL.F qui ont consulté mon travail et aussi aux enseignants pour leur aide et orientation durant mes études*

*En fin, Je remercie vivement et nos respects les plus distingués à tous les enseignants du département de biologie, université Abdelhamid Ibn badis.*

# *Dédicace*

- ✓ *Je dédie ce modeste travail à ceux qui ont tout sacrifié pour moi mes chers parents*
- ✓ *A mes frères et sœurs*
- ✓ *Et tous les membres de ma famille « Chouachi »*
- ✓ *A mes chers amis*
- ✓ *A tous mes chers enseignants et mes amis depuis le primaire jusqu'à l'université*
- ✓ *A ceux qui ont été là pour moi et que j'ai oublié des les citer*

# Sommaire

# *Tableau de matière*

Remerciement	
Dédicace	
Liste d'abréviation	
Liste des figures	
Introduction.....	01

## **Partie 1 : Rappel bibliographique :**

### **Chapitre 01 : *paracétamol***

1. Généralité sur le paracétamol .....	03
1.1 Historique.....	03
1.2 Les caractéristiques du paracétamol.....	04
1.3 Mécanisme d'action du paracétamol.....	06
1.4 Données pharmacocinétiques.....	08
2. Mécanismes d'hépatotoxicités du paracétamol physiopathologie.....	13
2.1 Liaisons covalentes et adduits protéiniques.....	13
2.2 Le glutathion.....	15
2.3 Modifications vasculaires hépatiques.....	17
2.4 Stress oxydatif.....	18
2.4.1 Réaction de Fenton.....	18
2.4.2 Monoxyde d'azote (NO).....	19
2.4.3 La NO synthase inductible.....	19
2.4.4 Les agents découplants.....	20
2.4.5 Rôle des neutrophiles.....	21
2.5 Inflammation.....	21
2.6 Mécanismes de réparation cellulaire.....	23
3. Facteur de risque d'hépatotoxicité.....	24
3.1 Généralité sur les hépatites médicamenteuse.....	24
3.2 Facteurs de risque d'hépatotoxicité au paracétamol.....	24

3.2.1 Jeûne et dénutrition .....	24
3.2.2 Grossesse.....	25
3.2.3 Prise chronique de paracétamol.....	26
3.2.4 Alcoolisme.....	26
3.2.5 Hépatopathie d'origine virale et alcoolique .....	29
3.2.6 Le tabagisme.....	30
3.2.7 Variations interindividuelles.....	31
3.2.8 Interactions médicamenteuses.....	32

## **Chapitre 02 : *La plante Curcuma Longa L***

1. Historique du curcuma Longa L.....	34
2. Classifications systématiques.....	34
3. Description de la plante.....	36
4. Composition chimique.....	40
5. Absorption et métabolisme de la curcumine.....	42
6. Effet antioxydant de la curcumine.....	44
7. Effet hépto protecteur de la curcumine.....	44
8. Effet anti-inflammatoire préventif de la curcumine.....	45

## **PARTIE 2 : Partie expérimentale**

### **Chapitre 01 : Matériels et méthodes**

I. Matériel et Méthodes.....	46
I.1 Matériel végétal.....	46
I.2 Animaux.....	46
I.3 Méthode 2.....	47
I.4 Étude histologique.....	48
I.4.1 Fixation.....	48
I.4.2 Déshydratation et inclusion.....	48
I.4.3 L'inclusion.....	48
I.4.4 Découpage.....	49
I.4.5 Colorations.....	49
I.4.6 Montage.....	50
I.4.7 Observation et lecture microscopique.....	50
I.5 Paramètre biochimique.....	50

I.5.1	Dosage sanguin des transaminases (ASAT/ALAT).....	50
I.5.2	Albumine.....	51
I.5.3	La gamma-glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT) .....	52
I.5.4	Glycémie.....	53

## **Chapitre 02 : Résultats et discussions**

1.	Résultats et discussions.....	54
1.1	Résultats.....	54
1.1.1	Evolution pondérale.....	54
1.1.2	Résultat de l'étude biochimique.....	55
1.1.3	Résultat de l'étude histologique des organes prélevés.....	60
1.2	Discussion.....	63
	Conclusions.....	68

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

## ***Liste d'abréviation :***

**NAPAP** : N-acétyl-para-aminophénol.

**POX** : peroxydase.

**COX** : cyclo-oxygénase.

**AINS** : anti-inflammatoires non stéroïdiens.

**FAAH** : Fatty Acide Amide Hydrolase.

**NAPQI** : N-acétyl-p-benzo-quinone imine.

**P450** : cytochrome.

**HPLC** : chromatographie en phase liquide à haute performance.

**$\alpha$ -GST** : l' $\alpha$ - glutathion-S-transférase.

**NO** : Monoxyde d'azote

**iNOS**: NO synthases inductibles .

**Le MIP2** : *macrophage inhibition protein 2*

**UGTs** : UDP-glucuronosyltransférases.

**GS-SG** : Le glutathion disulfide

**NFR-2** : Facteurs de transcription

**SULT** : sulfo-transférase.

**APG III** : Angiosperms Phylogeny Group.

**ASAT** : Aspartate aminotransférase.

**GOT** : le glutamate oxaloacétate transaminase.

**MDH** : malate déshydrogénase.

**NADH, H<sup>+</sup>** : Nicotinamide adénine dinucléotide.

**ALAT** : L'alanine aminotransférase.

**GPT** : glutamate-pyruvate transaminase.

**TP** : Taux de prothrombine.

**TQ** : Le Temps de Quick.

**AVK** : antivitamines.

**BCG** : Bromo Cresol Green.

**$\gamma$ -GT** : La gamma-glutamyl transférase.

## *Liste des figures :*

<b>N° DE FIGURET</b>	<b>TITRE</b>	<b>N° DE PAGE</b>
<b>01</b>	Dérivés de l'aniline	<b>03</b>
<b>02</b>	Schéma de la réaction d'acylation du paraminophénol en paracétamol	<b>03</b>
<b>03</b>	Mécanisme d'action du paracétamol	<b>06</b>
<b>04</b>	Métabolisation du paracétamol	<b>09</b>
<b>05</b>	Métabolisme du paracétamol en cas de surdosage	<b>10</b>
<b>06</b>	Glutathion et oxydo-réduction	<b>14</b>
<b>07</b>	Classification phylogénétique du végétal Curcuma	<b>33</b>
<b>08</b>	Quelques espèces de <i>Curcuma</i> source de curcumine	<b>34</b>
<b>09</b>	Rhizomes de <i>Curcuma longa</i> L.	<b>35</b>
<b>10</b>	Port de <i>Curcuma longa</i> . Souche connue sous le nom de <i>curcuma long</i> (en haut) et de curcuma rond (en bas).	<b>35</b>
<b>11</b>	Feuilletage de <i>Curcuma longa</i> L.	<b>36</b>
<b>12</b>	Inflorescence de <i>curcuma longa</i> L.	<b>37</b>
<b>13</b>	<i>Curcuma longa</i> , Linné.	<b>37</b>
<b>14</b>	Structures chimiques des constituants importants présents dans le curcuma.	<b>39</b>
<b>15</b>	Structure chimique de la curcumine : 1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxy-phényl) hepta-1,6-diène-3,5-dione.	<b>39</b>
<b>16</b>	Structure chimique des curcuminoïdes	<b>40</b>
<b>17</b>	Les principaux métabolites de la curcumine	<b>41</b>
<b>18</b>	L'évolution pondérale chez les souris intoxiquées « I » par paracétamol (100mg/kg et 200mg/kg), intoxiquées (100mg/kg et 200mg/kg) et traitées par le curcumin (2g/kg) « IT », témoins traitées « TT » par le curcumin (2g /kg) comparé aux témoins « T » durant 14 semaines d'expérimentation.	<b>51</b>

<b>19</b>	Le taux d'aspartate aminotransférase (ASAT) (U/l) chez les souris intoxiquées (I) par paracétamol (100mg/g) et (200mg/kg), intoxiquées et traitées (IT) par le curcumin (2g/kg), témoins traitées (TT) par le curcumin (2g/kg) comparées aux témoins (T) durant 14 semaines.	<b>52</b>
<b>20</b>	Taux d'alanine aminotransférase (ALAT) (U/l) chez les souris intoxiquées (I) par paracétamol (100mg/g) et (200mg/kg), intoxiquées et traitées (IT) par le curcumin (2g/kg), témoins traitées (TT) par le curcumin (2g/kg) comparées aux témoins (T) durant 14 semaines.	<b>53</b>
<b>21</b>	Taux de gamma-glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT) (U/l) chez les souris intoxiquées (I) par paracétamol (100mg/g) et (200mg/kg), intoxiquées et traitées (IT) par le curcumin (2g/kg), témoins traitées (TT) par le curcumin (2g/kg) comparées aux témoins (T) durant 14 semaines.	<b>54</b>
<b>22</b>	Taux de Glycémie (U/l) chez les souris intoxiquées (I) par paracétamol (100mg/g) et (200mg/kg), intoxiquées et traitées (IT) par le curcumin (2g/kg), témoins traitées (TT) par le curcumin (2g/kg) comparées aux témoins (T) durant 14 semaines.	<b>55</b>
<b>23</b>	Taux d'albuminémie chez les souris intoxiquées (I) par paracétamol (100mg/g) et (200mg/kg), intoxiquées et traitées (IT) par le curcumin (2g/kg), témoins traitées (TT) par le curcumin (2g/kg) comparées aux témoins (T) durant 14 semaines.	<b>56</b>
<b>24</b>	Etude microscopique des tissus hépatiques (Gx100) effectuée par la colorations (H.E) chez des souris intoxiquées « I » par paracétamol a une dose de (100et 200 mg/kg) durant 14 semaines comparées aux souris témoins « T ».	<b>57</b>
<b>25</b>	Etude microscopique des tissus hépatiques (Gx100) effectuée par la colorations (H.E) chez	<b>58</b>

	des souris intoxiquées par paracétamol a une dose de (100et 200 mg/kg) et traitées « <b>IT</b> » par le curcumin a une dose de (2g/kg) comparées aux souris témoins « <b>T</b> ».	
<b>26</b>	Etude microscopique des tissus hépatiques (Gx100) effectuée par la colorations (H.E) chez des souris traitées par le curcumin a une dose de (2g/kg) « <b>TT</b> » comparées aux souris témoins « <b>T</b> ».	<b>59</b>

# **Introduction**

## **Introduction :**

Le paracétamol est actuellement un traitement symptomatique antalgique et antipyrétique de référence, utilisé seul ou en association.

De prix de revient bas, le paracétamol (PARA) constitue l'un des produits les plus vendus et consommés au monde. Une étude épidémiologique publiée en 2002 témoigne de cet usage extensif (1/4 de la population américaine rapportant au moins une prise hebdomadaire). (kaufman et al.,2002).

Découvert en 1878 Par Mors et introduit dans la pharmacie quelques années plus tard, puis plus largement commercialisé dans les années 1950, autrement appelé acétaminophène, acétyl-p-aminophénol ou encore 4-hydroxy-acétanilide, le paracétamol possède des voies métabolique et des mécanismes d'action encore incomplètement compris.

En dehors de sa principale contre-indication, l'insuffisance hépatocellulaire, ce traitement bénéficia longtemps de l'aura d'une molécule réputée pour son innocuité aux posologies habituelles.

En Algérie, l'automédication une pratique très développée et l'ingestion des médicaments par ce phénomène anarchique représente un grand danger des différentes intoxications médicamenteuses qui ne bénéficient toujours pas d'une grande sensibilisation en direction des citoyens

Largement utilisé en Algérie, l'association paracétamol AINS est très souvent prescrite par les médecins dans le traitement des douleurs inflammatoires différentes

L'objectif de la présente étude est sur des données cliniques et expérimentales actuelles, d'étudier l'argumentaire évoquant le risque hépatotoxique du paracétamol à dose thérapeutique par une étude expérimentales in vivo chez les souris suisses connu pour ses propriétés anti-inflammatoire, le curcumin dont le principe actif le curcumine est utilisé en association avec le

paracétamol pour remplacer un traitement d'origine chimique (diclofénac) souvent prescrit et aussi pour évaluer son effet protecteur contre le stress oxydatif causé par le paracétamol.

Cette étude a été orienté vers l'évaluation de la balance bénéfices risque de cette association et ceci a travers le dosage des différents paramètres biochimiques et étude histologique en relation étroite avec le fonctionnement hépatique.

**Partie I :**  
**Rappel**  
**bibliographique**

# **Chapitre I :**

# **Paracétamol**

## **1. Généralité sur le paracétamol :**

### **1.1 Historique :**

Le paracétamol est aujourd'hui une molécule plus que centenaire. Son utilisation a connu un succès croissant au fil des années. La découverte de cette molécule populaire est pourtant née d'un heureux hasard (Amar & Schiff, 2007).

Morse, synthétise en 1878, une molécule qu'il nommait l'acétaminophène dont la première utilisation clinique c'est en 1887 par Von Mering (Bertolini et al., 2006) Huit ans plus tard, un professeur de Strasbourg, Adolf Kussmarl et ses deux étudiants, décident d'analyser les effets du naphthalène sur les parasitoses intestinales. La grande surprise, le produit étudié ne révèle aucun effet antiparasitaire, en revanche démontrant un effet antipyrétique très efficace. Par erreur le pharmacien avait délivré de l'acétanilide (l'acétanilide est un dérivé de l'aniline) au lieu du naphthalène demandé, qu'il démontrant un effet antipyrétique très efficace (Amar & Schiff, 2007).

L'acétanilide fut rapidement mis sur le marché. Cependant, l'utilisation clinique de l'acétanilide fut marquée de nombreux effets indésirables (Bilier, 2011).

En 1889, Karl Morner découvre la phénacétine et le paracétamol (Queneau, 2006). Et en 1893, Von Mering compare les effets et les toxicités de ces deux molécules. Il en ressort que le paracétamol présente une toxicité supérieure à la phénacétine. La toxicité rénale de la phénacétine sera démontrée quelques années plus tard (Mallet et al., 1994).

En 1946, les études sur le paracétamol reprennent avec Brodie et Axelrod (Mallet et al., 1994). Ils démontreront en 1948 que l'acétanilide était dégradé en N-acétyl-p-aminophénol et que ce métabolite était actif contre la douleur. Ils montreront également que l'acétanilide est responsable de la formation de méthémoglobine et non le paracétamol. En 1953 le laboratoire Sterling-Winthrop co commercialise le premier médicament à base de paracétamol sous le nom de Panadol® (Queneau, 2006).

Dès 1964, Ederd écrit pour la première fois les risques hépatiques liés à l'administration de paracétamol chez le chat et en 1966 des cas d'hépatotoxicité sévère sont rapportés chez l'Homme suite à l'ingestion de paracétamol (Schmitt,

1980). Cependant, le nombre de cas d'intoxication au niveau mondial ne cesse de croître, devenant aujourd'hui un enjeu de santé publique (Craig & Stitzel, 1994).

## 1.2 Les caractéristiques du paracétamol :

<b>Nom chimique</b>	N-acétyl-para-aminophénol (NAPAP) (Driad, 2009 ; Craig & Stitzel, 1994).
<b>Formule brute</b>	La formule brute du paracétamol est C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> (Prescott, 2000).
<b>Formule développée</b>	Sa formule développée est composée d'un cycle benzénique, d'un groupement hydroxyle et d'un groupement amide [Figure 01] (Prescott, 2000).
<b>Dénomination</b>	Le paracétamol est aussi nommé : Acétaminophène Para-acétaminophénol Hydroxy-4-acétanilide (Prescott, 2000).
<b>La classe chimique</b>	Le paracétamol appartient à la classe des dérivés de l'aniline, de celle-ci dérivent l'acétanilide, le paracétamol et la phénacétine [Figure 02] (Lechat <i>et al.</i> , 1978).
<b>Propriété physico-chimique</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Le paracétamol se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche, inodore, de saveur amère.</li><li>• La solubilité dans l'eau à 20°C est de 1.2g pour 100ml ce qui limite la quantité dans les préparations en sirops ou dans les comprimés effervescents.</li><li>• Sa liposolubilité est relativement faible : cela explique que le paracétamol ne soit pas retenu par les graisses de l'organisme.</li><li>• Le paracétamol est un acide faible (Lechat <i>et al.</i>, 1978).</li></ul>
<b>La classe thérapeutique</b>	Il est répertorié dans la classe des antalgiques, antipyrétiques (Monnot, 2014 ; Lechat, 2006), et anticoagulants (Sidibé, 2003).

<p><b>La forme galénique</b></p>	<p>Il existe plus de 600 produits contenant du paracétamol Commercialisés sur le marché sous différents conditionnements [Tableau 01] (Prescott, 2000).</p>
----------------------------------	---

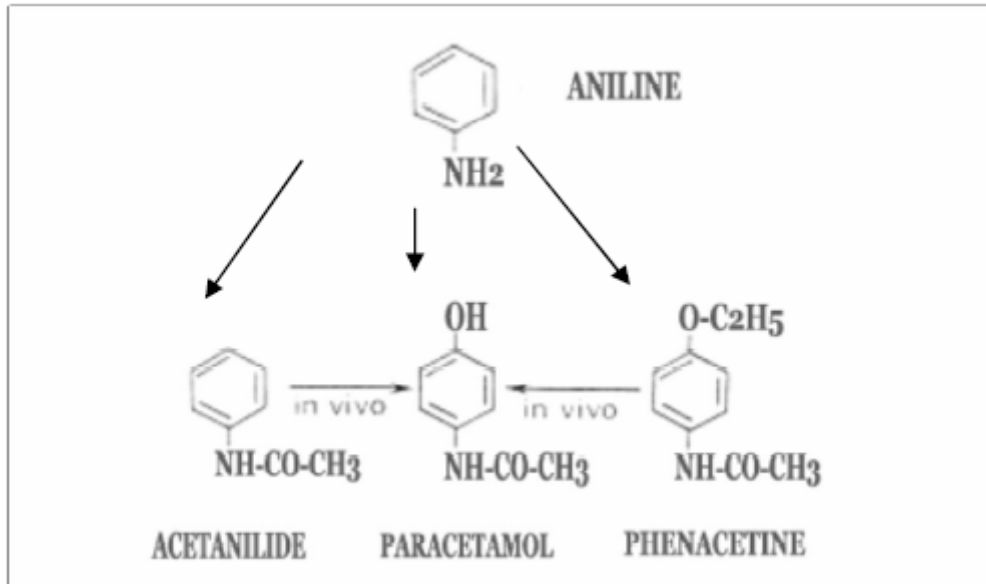


Figure 01 : Dérivés de l’aniline (Clement –guercia, 2003).

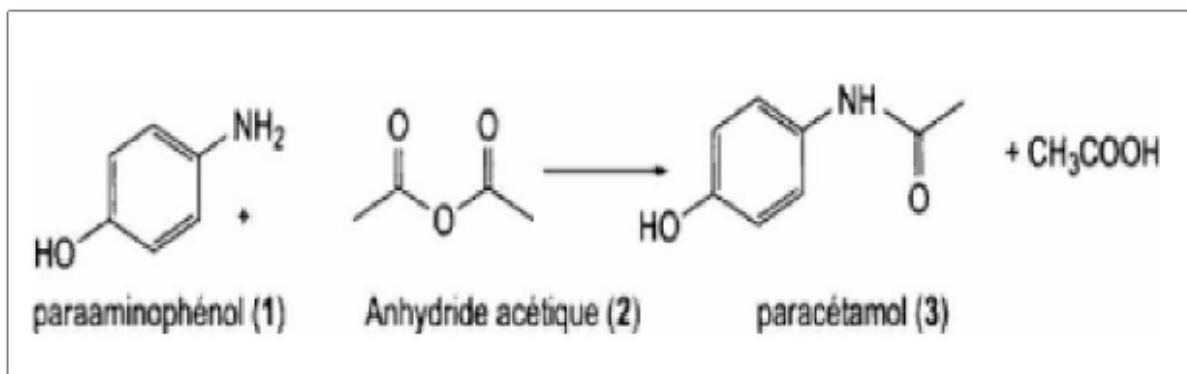


Figure 02 : Schéma de la réaction d'acylation du paraminophénol en paracétamol (Le marec,2005).

Tableau 01 : Conditionnement du paracétamol (Prescott, 2000).

### 1.3 Mécanisme d’action du paracétamol :

- **Activité antipyrétique :**

<b>Comprimés</b>	Doliprane®, Efferlgan®, Tylenol®
<b>Gélules</b>	Dafalgan®
<b>Sirop</b>	Oralgan®
<b>Suspension buvable</b>	Efferalgan®
<b>Suppositoires</b>	Dafalgan®, Doliprane®, Dolko®
<b>Lyophilisats</b>	Paralyoc®
<b>Effervescents</b>	Claradol®, Doliprane®, Panadol®, Efferalgan®

L'acétaminophène peut réduire la fièvre par action sur le centre thermorégulateur hypothalamique en inhibant l'action des pyrogènes endogènes et la synthèse des prostaglandines.

- **Activité analgésique :**

Plus d'un siècle après son introduction en thérapeutique, le mécanisme d'action de l'acétaminophène dans le traitement de la douleur demeure incertain et plusieurs hypothèses ont été avancées.

- 1) La première a été l'inhibition de la synthèse des prostaglandines au niveau du système nerveux central. L'acétaminophène serait en mesure d'agir sur le site peroxydase (POX) de la prostaglandine H2 synthase alors que les AINS agissent sur le site cyclo-oxygénase (COX) (Beaulieu, 2013).

Les prostaglandines H2 synthases comportent deux sites :

- **Un site actif cyclo-oxygénase COX-1 et COX-2 :** ce site est la cible d'une majorité des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), le paracétamol n'aurait qu'une action indirecte sur lui.
- **Un site peroxydase POX :** sur lequel agirait principalement le paracétamol par accélération de la dégradation et le captage des radicaux libres (Jouzeau *et al.*, in2004).

- 2) L'hypothèse la plus retenue aujourd'hui implique une interaction avec le système sérotoninergique au niveau du système nerveux central. Les différentes étapes de l'action analgésique de l'acétaminophène [Figure 03] sont :

- ✓ L'acétaminophène est déacétylé en p-aminophénol par le foie.
- ✓ Le p-aminophénol dans le cerveau est biotransformé par la Fatty Acide Amide Hydrolase (FAAH) en AM404.
- ✓ L'AM404 peut alors renforcer l'activité des récepteurs cannabinoïdes CB1 au niveau central ainsi que des récepteurs TRPV1.
- ✓ Cela renforce également l'activité de la voie sérotoninergique descendante inhibitrice, pour inhiber la transmission de l'information douloureuse (Beaulieu, 2013).

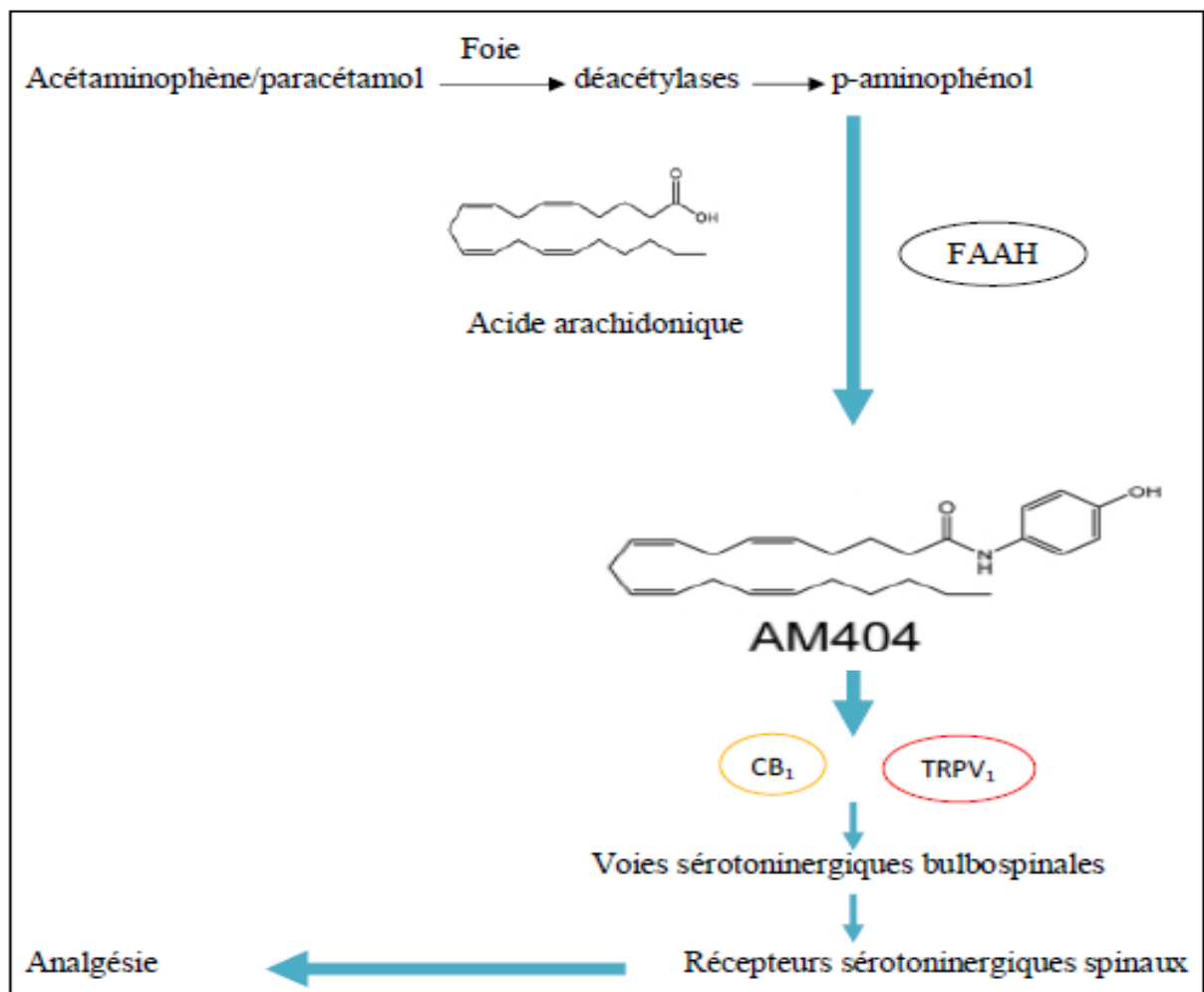


Figure 03 : Mécanisme d'action du paracétamol (Beaulieu, 2013).

## 1.4 Données pharmacocinétiques :

### ❖ L'absorption :

L'absorption du l'acétaminophène par voie orale au niveau de l'intestin grêle proximal est complète et rapide, et l'effet de premier passage hépatique est faible (25 %). Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes :

- En 10-15 min après perfusion intraveineuse (la puissance analgésique de la voie intraveineuse n'est pas modifiée en comparaison de la voie orale).
- En 15 min avec des comprimés effervescents.
- En 30 à 60 min après administration orale.
- En 2 à 3 h après administration intra rectale (cette dernière expose à une résorption lente et à une biodisponibilité imprévisible) (Beaulieu, 2013).

### **❖ Distribution :**

Le paracétamol diffuse rapidement et très largement dans les compartiments liquidiens de l'organisme sauf dans les graisses, selon un modèle ouvert à deux compartiments. Son volume de distribution est de 0.9 à 1.01 l/ kg les concentrations plasmatiques varient selon les sujets et les conditions d'administration. Le paracétamol est très faiblement lié aux protéines plasmatiques notamment l'albumine (5 à 20%) mais cette liaison augmente en cas de sur dose. La concentration maximale est atteinte entre 30 et 90 min après l'absorption (Mukundabantu, 2006 ; El bahri, 2015).

### **❖ Demi-vie :**

La demi-vie du paracétamol dans le sang est de l'ordre de 2 heures. Elle peut aller jusqu'à 12 heures en cas de surdosage, ce qui augmente le risque de cytolysse hépatique.

Les mesures de concentration plasmatique ont montré qu'un intervalle de 4 heures entre chaque prise de paracétamol, quelle que soit sa forme galénique, permet d'obtenir une paracétamolémie à la phase de plateau en moins de 24 heures (El abbouni, 2012).

### **❖ Métabolisation :**

La biotransformation du paracétamol est réalisée en deux principales étapes : La réaction de fonctionnalisation oxydative des CYP va le transformer en hydroxy paracétamol, et la réaction de conjugaison va permettre le transfert d'un groupe fonctionnel polaire sulfate ou glucuronide pour le rendre suffisamment

hydrosoluble et susceptible d'être éliminé (Houin, 1990 ; Labaune, 1984 ; Laura, 2003 ;).

Les deux principales voies de métabolisations sont :

- **La glucuroconjugaison** : elle est représentée 50 à 55 % du métabolisme du paracétamol.

Cette voie n'est active qu'à partir de l'âge de 9-12 ans.

- **La sulfoconjugaison** : elle représente 20 à 40 % du métabolisme du paracétamol et semble être saturée à des doses relativement faibles (0.5 à 3g). C'est la principale voie de métabolisation des nourrissons et des jeunes enfants.

**Aux doses thérapeutiques** habituelles, 90% du paracétamol subit une métabolisation hépatique au niveau du cytosol des hépatocytes (Faber *et al.*, 2013). Cette conjugaison s'effectue sur le groupement OH phénolique et mobilise l'acide glucuronique ou l'acide sulfurique (Lumann & Mohr, 2003), le paracétamol est ainsi transformé en dérivés glucuro- ou sulfoconjugués non toxiques qui seront éliminés dans les urines (Bouchera, 2011). Ces réactions catalysées par des UDP-glucuronosyltransférases (UGTs) et des sulfotransférase (Houin, 1990 ; Laura, 2003).

Les 10% restant sont métabolisés par les cytochromes P450 (CYP2E1 et CYP3A4) en un intermédiaire électrophile fortement réactif, le N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) (Bouchera, 2011). Ce dernier étant un composé toxique pour les hépatocytes. Il est électrophile et se fixe par liaison chimique covalente irréversible «SH » aux macromolécules hépatocytaires (Burnat *et al.*, 1994).

La région Centro lobulaire du foie est la plus touchée car elle est particulièrement riche en Cytochrome P450 (Burnat *et al.*, 1994). Il est rapidement détoxifié (Graham & Scott, 2005) par le glutathion réduit et éliminé dans les urines après conjugaison à la cystéine et à l'acide mercapturique [Figure 04] (keck, 1992 ; Poletti, 1996). Le glutathion permet d'éviter la liaison aux protéines cellulaires et de contrôler l'élimination de NAPQI sous forme inactive dans les urines (Berger, 1997).

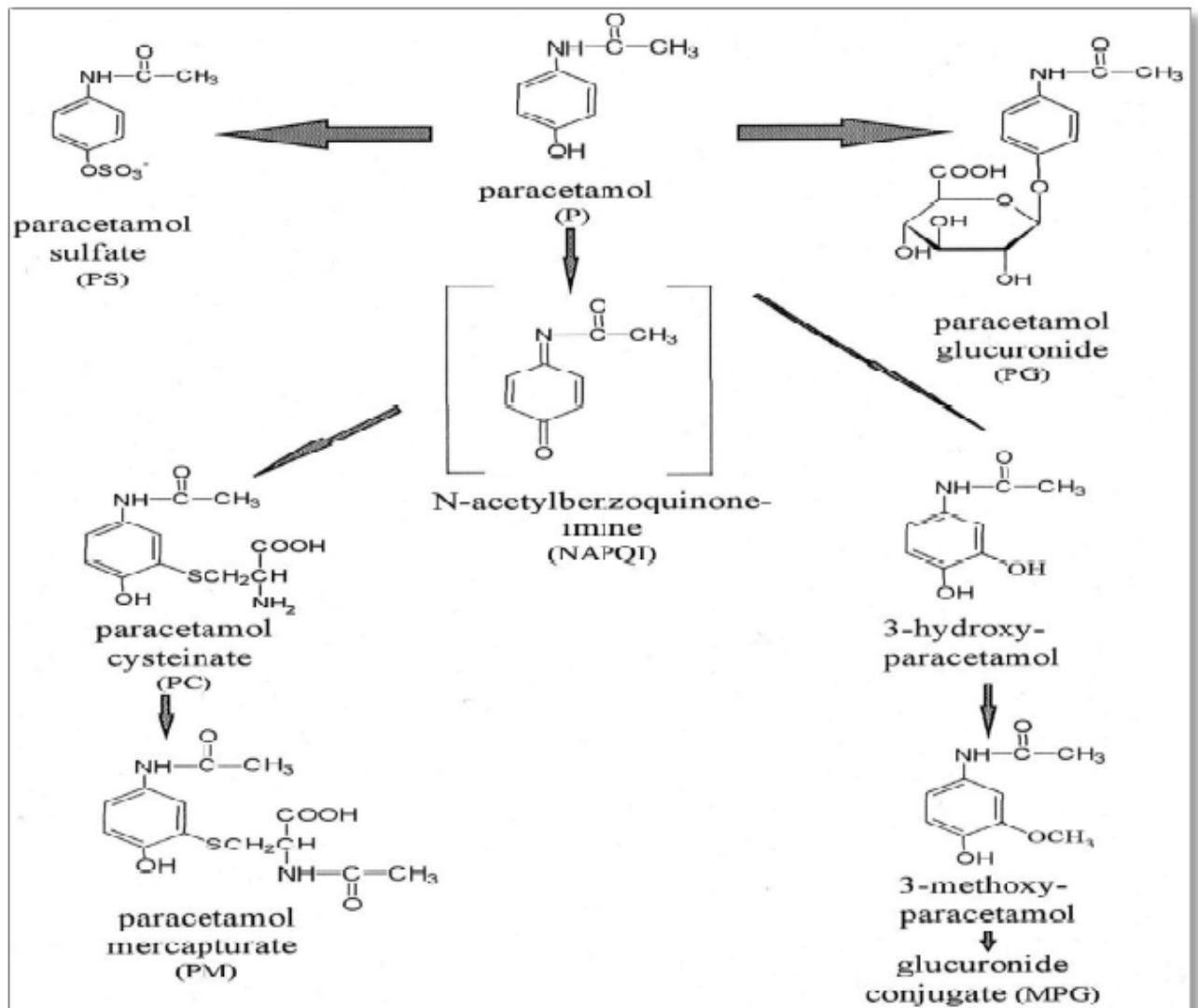
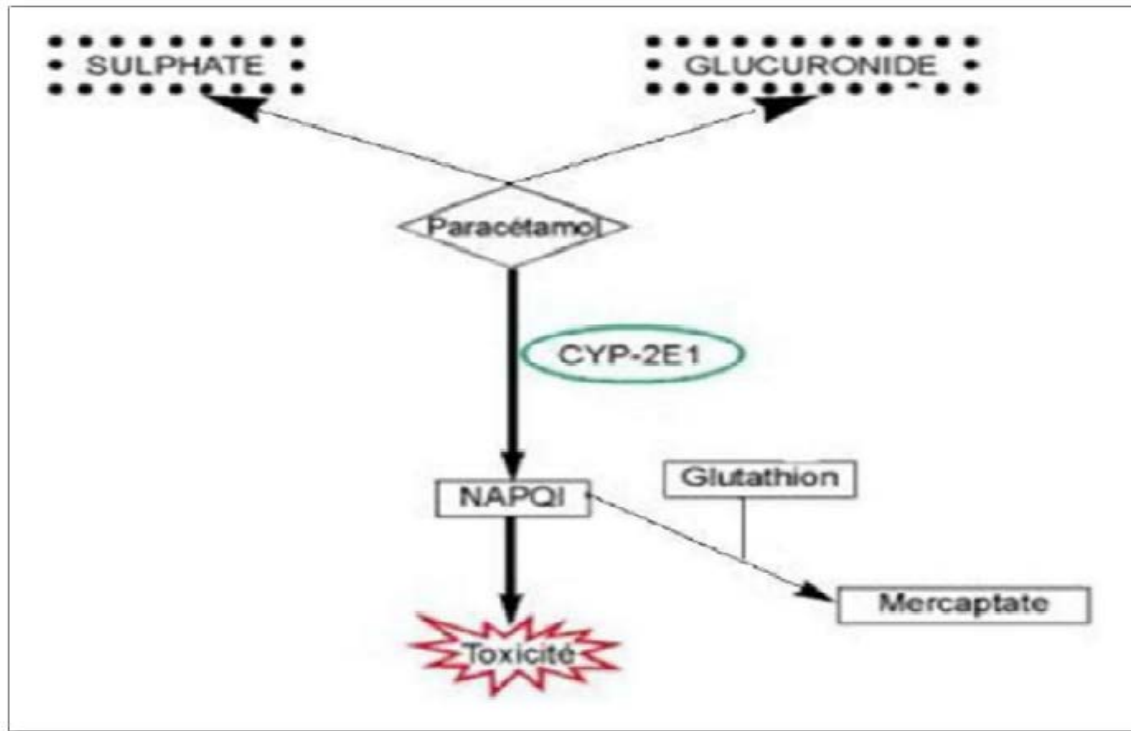


Figure 04 : Métabolisation du paracétamol (Burnat *et al.*, 1994).

**En cas du surdosage :** Si le paracétamol est pris en excès, les systèmes de sulfoconjuguaisons et glucuronoconjuguaisons sont saturés. Ainsi, la métabolisation du paracétamol excédentaire se fait par la voie du cytochrome P450, ce qui aboutit inévitablement à la formation de NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinone-imine). Ce composé toxique, produits dans des quantités trop importantes, va bientôt utiliser tous les stocks de glutathion de l'organisme. Le procédé de détoxification une fois dépassée, le NAQPI va s'accumuler dans l'organisme, et sa toxicité hépatique se fera sous la forme d'une cytolysse hépatique, par atteinte mitochondriale

principalement. Donc le paracétamol est hépatotoxique en fonction de la dose [figure 05] (Lee, 2003).



**Figure 05 :** Métabolisme du paracétamol en cas de surdosage (El hahri, 2015).

### ❖ Elimination

L'élimination des métabolites du paracétamol se fait par voie urinaire, à savoir : moins de 5% du paracétamol sous forme inchangée, 5% sous forme de cystéine et de métabolites de l'acide mercapturique (Driad, 2009), 55% sous forme de métabolites glucuronides, 30% sous forme de métabolite sulfates (Makin et al., 1995).

La demi-vie d'élimination est prolongée suivant la dose toxique pouvant occasionner la survenue d'une insuffisance rénale organique (Roujas & Sorkinem, 1989). Elle est variée de 2 heures à 2 heures 30. Il existe peu de variabilité interindividuelle La demi-vie ne diminue qu'en cas de clairance inférieure à 10 ml/min. Dans ce cas, il est recommandé d'espacer les prises de 8 heures minimum sans dépasser 3 g par jour. Pour les formes suppositoires, la  $\frac{1}{2}$  vie d'élimination est de 4 à 6 heures (Makin et al., 1995).

En cas d'insuffisance rénale, l'élimination du paracétamol et de ses métabolites est retardée (Driad, 2009).

## **2. Mécanismes d'hépatotoxicité du paracétamol physiopathologie :**

### **2.1 Liaisons covalentes et adduits protéiniques :**

L'implication pathologique de la formation des liaisons covalentes découle de l'observation selon laquelle l'apparition des signes de toxicité après surdosage suit le nombre de liaisons covalentes formées entre paracétamol et groupements cystéine des protéines (Jollow D.J., Mitchell J.R., Potter W.Z. et Al.1973). Initialement, le marquage par des isotopes radioactifs permet la quantification de ces liaisons covalentes sur les coupes histologiques. Secondairement, l'évolution des techniques biochimiques permet la détection d'adduits protéiniques, le 3-cystéinyl-acétaminophène, tant localement que dans le sérum. L'apparition de ces adduits est étroitement corrélée à la lyse hépatocytaire, le taux sérique culminant dans les heures suivant l'élévation sérique des transaminases (Muldrew K.L., James L.P., Coop L. et Al., 2002). Ainsi, la présence sérique d'adduits protéiniques de paracétamol semble un marqueur fiable témoignant de la formation d'adduits au niveau hépatique, et donc potentiellement de l'hépatotoxicité du paracétamol.

Roberts, en 1991, confirme par analyse immuno- histochimique sur les coupes de foie de souris intoxiquées cette coïncidence entre hépatotoxicité et présence d'adduits protéiniques (Roberts D.W., Bucci T.J., Benson R.W. et Al.,1991). En effet, dans les heures suivant l'intoxication, les vacuoles et la picnose nucléaire témoignant de la nécrose correspondent au niveau histologique aux zones de parenchyme hépatique les plus riches en adduits protéiniques. Par immuno- marquage aux anticorps anti-adduits, on note que la concentration maximale d'adduits se situe au niveau Centro lobulaire, alors que les espaces péricentraux en sont presque totalement dépourvus. Les hépatocytes marqués par ces anticorps vont secondairement montrer des signes d'évolution vers la nécrose, et inversement, la grande majorité des hépatocytes évoluant vers la nécrose contiennent les adduits protéiniques de paracétamol. Roberts établit donc une corrélation forte entre cette atteinte métabolique hépatocytaire et la progression vers la mort cellulaire par nécrose. Ces affirmations sont corroborées cliniquement par les travaux d'Hinson portant sur des prélèvements sériques de patients victimes d'overdose. Les taux d'adduits les plus élevés sont retrouvés chez les patients présentant les intoxications les plus sévères (Hinson J.A., Roberts D.W., Benson R.W. et Al., 1990).

Le développement contemporain des techniques de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) permet une détection sensible et spécifique d'un adduit protéinique de paracétamol, le 3- cystéinyl-acétaminophène. Cette méthode constitue une aide diagnostique chez les patients présentant une défaillance hépatique d'étiologie inconnue (Davern T.J. 2nd, James L.P., Hinson J.A. et Al.,2006). En effet, 20% des patients en insuffisance hépatique de cause non déterminée ont une détection positive des adduits de paracétamol sériques, suggérant fortement l'implication du paracétamol dans la survenue de l'hépatotoxicité. Les taux d'adduits persistent et demeurent détectables jusqu'à 12 jours après une intoxication aiguë (James L.P., Letzig L., Simpson P.M. et Al.,2009).

Cependant, si l'augmentation sérique du taux d'adduits est le reflet de la toxicité du paracétamol, le lien de causalité entre présence d'adduits et développement de cette toxicité pose question. Les travaux de Henderson, en 2000, portent sur la mesure de la déplétion des stocks de glutathion induite par le paracétamol chez des souris knock-out pour l' $\alpha$ - glutathion-S-transférase ( $\alpha$ -GST), la transférase catalysant la conjugaison du NAPQI au glutathion (Henderson C.J., Wolf C.R., Kitteringham N. et Al.2000). Après une dose toxique de paracétamol, le pool de glutathion est réduit de 90% au moins chez les souris sauvages, et de 70% chez les souris knock-out. On observe que les souris knock-out pour l' $\alpha$ -GST sont moins sensibles à l'hépatotoxicité induite par le paracétamol que les souris sauvages. Cependant, le taux d'adduits est similaire dans les deux groupes. L'ensemble de ces données semble dissocier la formation de liaisons covalentes -et donc d'adduits- du développement d'une hépatotoxicité. Le mécanisme de déplétion des stocks en glutathion hépatocytaire pourrait être une explication plus vraisemblable pour certains auteurs.

En ce sens, l'expérimentation de Boobis, en 1986, décrit l'apparition d'une hépatotoxicité sur des suspensions d'hépatocytes de hamster après 90 minutes d'incubation dans une solution de paracétamol (Boobis A.R., Tee L.B., Hampden C.E. et Al.,1986). Les hépatocytes sont secondairement rincés et incubés dans une solution classique sans paracétamol. L'analyse microscopique met en évidence des signes de toxicité. L'adjonction d'une solution de N-acétyl-cystéine lors de la réincubation protège les hépatocytes de la survenue de la toxicité, alors même que les liaisons covalentes sont théoriquement formées. Même si le taux d'adduits formés est fortement corrélé au développement de l'hépatotoxicité, la constitution de liaisons covalentes semble plus le reflet de la toxicité que le mécanisme lésionnel en tant que tel. L'hypothèse d'un mécanisme découlant de la déplétion

en glutathion, comme la majoration du stress oxydatif, semble fondamentale dans les recherches sur les mécanismes de l'hépatotoxicité.

## **2.2 Le glutathion :**

Le glutathion, tri-peptide composé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine, constitue un pilier de la défense anti-oxydante de la cellule. Il intervient dans la détoxification des métabolites des xénobiotiques comme le paracétamol. Les patients dont les réserves sont amoindries sont une population particulièrement à risque d'hépatotoxicité (Lauterburg B.H., 2002).

Les concentrations cellulaires de glutathion sont de l'ordre de 4 mMol/L et la forme réduite représente 98% du glutathion total. Les concentrations plasmatiques circulantes avoisinent les 10 mMol/L. Le glutathion réduit, le glutathion disulfide et les adduits de glutathion sont transportés activement du foie vers la bile. Le foie est la principale source de glutathion dans l'organisme, d'où une étroite corrélation entre taux hépatiques et taux plasmatiques. Une grande partie du glutathion produit est aiguillé vers la circulation, où il est distribué aux organes disposant de l'enzyme qui le catabolise, la gamma-glutamyl-transférase ( $\gamma$ -GT). La cystéine issue du catabolisme est secondairement recyclée pour la synthèse de glutathion. Le glutathion constitue donc une réserve importante de cystéine, acide aminé toxique à haute concentration dans l'organisme. Les conséquences pathologiques de la variation des taux de glutathion cellulaire s'expliquent par son rôle central dans l'homéostasie anti-oxydant (DeLeve L.D., Kaplowitz N., 1991).

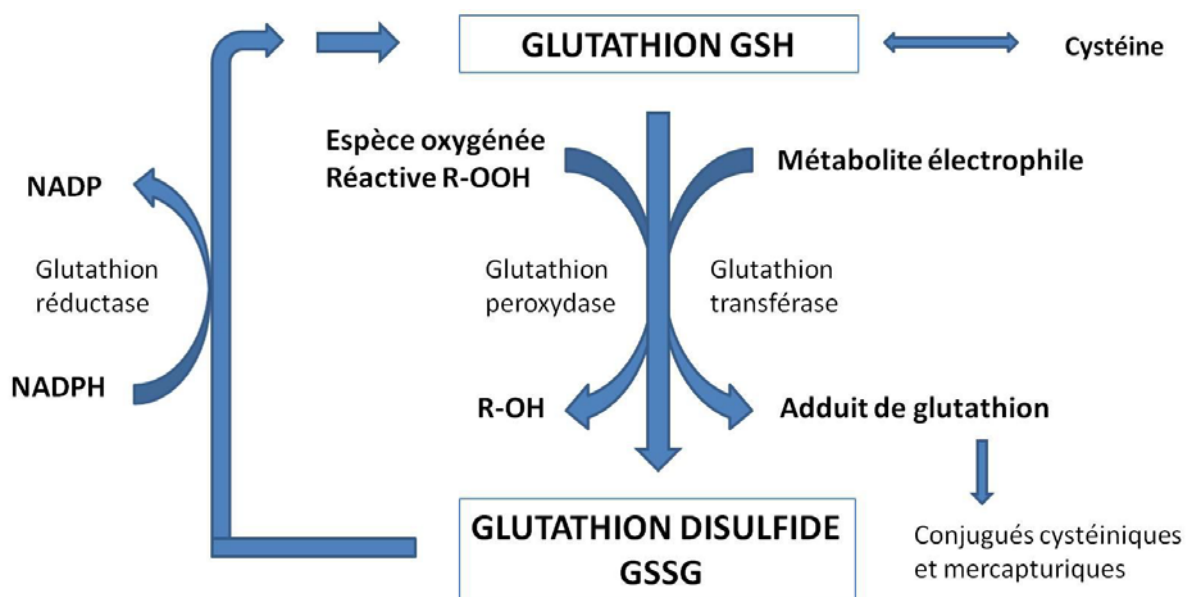
Le glutathion est en effet un puissant nucléophile qui réagit avec les métabolites électrophiles cellulaires pour former des adduits de glutathion.

Ces adduits sont ensuite sécrétés sous forme de dérivés cystéiniques et N-acétyl-cystéiniques, encore appelés acides mercapturiques. Cette réaction de conjugaison a lieu spontanément, mais est fréquemment accélérée par l' $\alpha$ -glutathion-S-transférase ( $\alpha$ -GST). Cette enzyme prévient en conséquence la formation d'adduits entre métabolite réactif et d'autres macromolécules. Lorsque la concentration cellulaire en glutathion diminue et atteint moins de 10% du taux normal, le glutathion piège insuffisamment le NAPQI, d'où la formation d'adduits de paracétamol. Bien que la synthèse de glutathion soit stimulée lorsque sa concentration sérique décroît, la cystéine peut constituer un facteur limitant.

L'administration de précurseurs de la cystéine comme la N-acétyl-cystéine ou la méthionine permet de corriger ou prévenir toute carence.

En parallèle, le glutathion est garant du maintien de l'homéostasie l'oxydoréduction. Les cellules, en particulier leurs mitochondries, sont constamment exposées au stress oxydatif. La réduction du peroxyde d'hydrogène par le glutathion est catalysée par la glutathion peroxydase.

Le glutathion disulfide qui en résulte, GS-SG, est à son tour réduit en glutathion par la glutathion réductase en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Si l'oxydoréduction est débordée par la formation de glutathion disulfide, ce dernier est exporté directement hors de la cellule. La déplétion en glutathion déséquilibre la balance oxydative et semble avoir un rôle décisif dans l'orientation de la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose (Hall A.G.,1999). Par exemple, l'induction des heat-shock protéines induites par la réponse cellulaire au stress augmente la concentration de glutathion et facilite l'inhibition de l'apoptose (Lauterburg B.H., 2002).



**Figure 06 :** Glutathion et oxydo-réduction (Lauterburg B.H., 2002).

**2.3 Modifications vasculaires hépatiques :**

Le rôle de la déplétion en glutathion a aussi été évoqué dans les phénomènes vasculaires accompagnant l'installation de la défaillance hépatique. Chez l'homme comme chez le rongeur, l'intoxication au paracétamol s'accompagne d'un état de congestion hépatique. Walker, en 1980, décrit lors d'observations morphologiques que la congestion résulte d'une accumulation de globules rouges dans l'espace de dix avec collapsus de la lumière des sinusoides (Walker R.M., Racz W.J., McElligott T.F.,1985). Les variations pondérales de parenchyme hépatique sont nettes, résultant de la variation des débits sanguins régionaux. Le poids augmente progressivement jusqu'à la 6ème heure, où il est environ doublé, puis décroît progressivement dans les 24 heures. L'utilisation de radio-isotopes montre que la concentration globale en hémoglobine du parenchyme hépatique est quadruplée, s'accompagnant d'un pic de transaminases sériques reflétant la lyse hépatocytaire (Roberts D.W., Bucci T.J., Benson R.W. et Al.,1991). La pression de perfusion hépatique et la pression veineuse porte sont simultanément effondrées. L'administration de Nacétyl-cystéine quelques heures après intoxication s'accompagne d'une correction partielle de ces modifications (Walker R.M., Racz W.J., McElligott T.F.,1985).

L'hypothèse de l'atteinte micro vasculaire au niveau Centro lobulaire est discutée par de nombreux auteurs, avec une possible implication de l'endothélium sinusoidal hépatique (Lim S.P., Andrews F.J., O'Brien P.E.,1995). De Leve met ainsi en évidence une atteinte des cultures d'endothélium baignées dans une solution de paracétamol alors que le taux en glutathion de ces cellules est fortement diminué (DeLeve L.D., Wang X., Kaplowitz N. et Al.,1997). L'adjonction de glutathion à la solution prévient en partie les modifications cellulaires contemporaines du développement de l'hépatotoxicité. Ces données sont confirmées par Ito en 2003, avec la mise en évidence de lésions des cellules endothéliales des sinusoides précédant l'apparition de la souffrance hépatocytaire (Ito Y., Bethea N.W., Abril E.R. et Al.,2003). En effet, les observations microscopiques retrouvent un œdème de l'endothélium associé à une infraction des érythrocytes au sein de l'espace extra sinusoidal de Disse. L'analyse de l'endothélium au plan fonctionnel révèle des altérations localisées dans les régions Centro lobulaires et épargnant l'espace péri-portal. Il est donc évoqué une possible toxicité du paracétamol touchant l'endothélium sinusoidal Centro lobulaire tant au plan morphologique que fonctionnel, occasionnant une réduction de la perfusion sinusoidale. L'atteinte endothéliale et l'atteinte microcirculatoire

résultante constituent une clé potentielle pour appréhender la toxicité du paracétamol.

## **2.4 Stress oxydatif :**

### **2.4.1 Réaction de Fenton :**

Le stress oxydatif met en jeu une réaction de Fenton, un procédé d'oxydation avancé basé sur l'oxydoréduction consécutive à la formation cellulaire de superoxydes. La dismutation des ions superoxydes aboutit à la formation de peroxyde d'hydrogène. La réduction des peroxydes par des ions ferreux concourt à la formation de radicaux hydroxyles - extrêmement réactifs- à l'origine de peroxydations lipidiques, d'oxydation de protéines et d'acides nucléiques. Divers mécanismes peuvent occasionner la formation de ces superoxydes, comme les agents découplants, capables d'abolir la phosphorylation de l'ADP en ATP sans pour autant inhiber l'oxydation des substrats. Parmi ces agents découplants, on retrouve entre autres le cytochrome P450 2E1 ou la NADPH oxydase. (Koop D.R.,1992) (Sies H.,1992).

A l'occasion d'une intoxication au paracétamol, le NAPQI épuise les en glutathion. Ainsi, un mécanisme majeur de détoxification cellulaire est compromis, le glutathion étant en effet le cofacteur de la détoxification des peroxydes par la glutathion peroxydase. Suite à cette déplétion en glutathion, les taux intracellulaires de peroxydes s'élèvent, provoquant un stress oxydatif via une réaction de Fenton. En ce sens, Wendel rapporte en 1979 que l'administration de paracétamol et d'ions ferreux à des souris s'accompagne d'une augmentation de l'éthane exhalé, un indice de mesure de la peroxydation lipidique (Wendel A., Feuerstein S., Konz K.H.,1979). De même, Albano en 1983 publie que l'incubation d'hépatocytes de souris dans une solution de paracétamol s'accompagne d'une majoration du stress oxydatif, comme en témoignent les réactions de peroxydation lipidique (Albano E., Poli G., Chiarpotto E. et Al.,1983). De plus, Ito en 1994 confirme le rôle majeur des ions ferreux sur un modèle d'hépatocytes de rats et de souris (Ito Y., Suzuki Y., Ogonuki H. et Al.,1994). Collectivement, ces auteurs que les chélateurs du fer comme la deféroxamine empêchent le développement de l'hépatotoxicité, tandis que l'adjonction de fer au milieu d'incubation des hépatocytes restaure leur sensibilité au paracétamol. L'ensemble de ces expérimentations est en faveur de lésions oxydatives occasionnées par un mécanisme de Fenton.

**2.4.2 Monoxyde d'azote (NO) :**

La découverte du NO comme molécule fondamentale dans la signalisation cellulaire a conduit à explorer les mécanismes de survenue du stress oxydatif. Le NO réagit avec les superoxydes de façon quasi instantanée pour former du peroxyde d'azote, agent à la fois oxydant et nitrant. Le peroxyde d'azote est détoxifié au sein de l'hépatocyte par le glutathion, dont les stocks cellulaires sont amoindris par le NAPQI à l'occasion de l'intoxication au paracétamol. La formation de 3-nitrotyrosine et de protéines nitrées est utilisée comme marqueur du stress nitrosant. L'adjonction de paracétamol à dose toxique sur des foies de souris provoque la formation de 3-nitrotyrosine au niveau des protéines hépatiques de la région Centro lobulaire. La formation d'adduits protéiniques et de nitrotyrosine a lieu au sein des mêmes cellules, à savoir les cellules qui vont évoluer vers la nécrose (Hinson J.A., Pike S.L., Pumford N.R. et Al.,1998). La localisation du stress oxydatif et nitrosant semble donc étroitement corrélée au site de toxicité.

Les seuls hépatocytes développant les phénomènes de nécrose sont ceux où le stress oxydatif est le plus prononcé, et de nombreux arguments sont en faveur de l'implication des espèces réactives oxygénées et nitrées dans la survenue d'une hépatotoxicité liée au paracétamol (Hinson J.A., Roberts D.W., James L.P.,2010).

**2.4.3 La NO synthase inductible :**

Parmi les causes occasionnant un essor du stress oxydatif, le rôle des NO synthases inductibles (iNOS) hépatiques a fait l'objet de travaux sur les rats et souris. Gardner rapporte que l'administration de paracétamol provoque l'induction des iNOS dans les hépatocytes Centro lobulaires (Gardner C.R., Heck D.E., Yang C.S. et Al.,1998). De plus, l'administration aux rongeurs d'aminoguanidine, un inhibiteur des iNOS, inhibe partiellement l'hépatotoxicité. Chez la souris knock-out pour la iNOS, Mickael observe lors du traitement par paracétamol des taux de transaminases deux fois moins élevés que chez les souris sauvages, sans qu'il y ait de différence de score histologique d'hépatotoxicité. Chez ces mêmes souris knock-out, la nitration protéique est diminuée mais pas absente. Ces données suggèrent qu'iNOS pourrait jouer un rôle dans les phénomènes de nitration protéique (Michael S.L., Mayeux P.R., Bucci T.J. et Al.,2001).

## 2.4.4 Les agents découplants :

De tous les mécanismes occasionnant une augmentation des espèces réactives oxygénées et nitrées, plusieurs sont évoqués lors de la survenue d'une intoxication au paracétamol : l'agent découplant cytochrome P450 2E1 (Koop D.R.,1992), la NAPH oxydase activée et le découplage mitochondrial.

Dans chacun des cas, l'augmentation des taux de superoxydes provoque une augmentation de la formation d'autres espèces oxygénées : peroxydes d'hydrogène et donc peroxynitrites cellulaires. Le métabolisme du paracétamol en NAPQI s'articule autour du CYP2E1, vecteur de la toxicité in vivo et in vitro, même si d'autres cytochromes comme CYP1A2 et CYP3A4 sont impliqués de façon moins importante dans cette voie métabolique.

Cette participation de CYP2E1 s'appuie sur la constatation selon laquelle les souris dont le CYP2E1 a été inhibé sont beaucoup moins sensibles au paracétamol que des souris témoins, et modérément moins sensibles en comparaison souris inhibées pour CYP1A2. De plus, le clonage du gène humain CYP2E1 chez ces souris CYP2E1<sup>-/-</sup> provoque une restauration des effets hépatotoxiques (Gonzalez F.J.,2007).

Le suivi du stress oxydatif occasionné par CYP2E1 est réalisé par analyse urinaire des métabolites dérivés du NAPQI : conjugués paracétamol-cystéine, conjugués paracétamol-N-acétylcystéine, et conjugué paracétamol-glutathion. L'administration de doses toxiques de paracétamol provoquant une augmentation significative des concentrations hépatiques de peroxyde d'hydrogène, Hinson suggère que le CYP2E1 est au cœur d'un mécanisme conduisant à l'augmentation des espèces oxygénées réactives cellulaires. Le stress oxydatif survenant via une réaction de Fenton est ainsi impliqué dans la survenue de l'hépatotoxicité, expliquant ainsi que les chélateurs du fer minorent cette toxicité. (Hinson J.A., Roberts D.W., James L.P.,2010)

Peu de données plaident en faveur de l'implication majeure de la NADPH oxydase dans le développement de l'hépatotoxicité au paracétamol. Cette enzyme majeure de la chaîne respiratoire génère des superoxydes au sein des cellules de Kupffer. Les souris chez qui cette enzyme est inhibée ne montrent pas de différence en termes de sensibilité et de taux de protéines nitrées lorsqu'elles sont comparées aux souris sauvages. De plus, l'antagonisation de cette enzyme en condition de surdosage n'influe pas sur la toxicité (Cover C., Liu J., Farhood A. et Al.,2006).

## 2.4.5 Rôle des neutrophiles :

D'autres mécanismes mineurs ont été évoqués pour expliquer la physiopathologie de la majoration du stress oxydant, en particulier le rôle des polynucléaires neutrophiles. Ces leucocytes, à partir de peroxyde d'hydrogène, produisent de l'acide hypochloreux via la myéloperoxydases. L'hypochlorite réagit avec les radicaux tyrosine pour former la 3-chlorotyrosine. Liu rapporte que les souris dépourvues de polynucléaires neutrophiles semblent nettement moins sensibles à l'hépatotoxicité du paracétamol (Liu Z.X., Han D., Gunawan B. et Al.,2006), mais il n'est pas retrouvé de résidus chlorotyrosine dans les foies des souris traitées par paracétamol (Hasegawa T., Malle E., Farhood A. et Al.,2005), aussi l'implication des myéloperoxydases des neutrophiles demeure incertaine.

## 2.5 Inflammation :

De nombreux travaux s'interrogent sur la place de l'inflammation dans la survenue d'une hépatotoxicité liée au paracétamol. L'étude de Laskin met en évidence une activation des cellules de Kupffer, les hépatiques (Laskin D.L., Pilaro A.M.,1986). L'activation de ces cellules de Kupffer s'accompagne de modification de l'homéostasie immunitaire via des réponses cytokiniques pro- et anti-inflammatoires, impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation et la mort cellulaire. Parmi ces cytokines, les taux de TNF $\alpha$  sont augmentés dans l'intoxication au paracétamol. Cette cytokine active le recrutement des cellules de l'inflammation et induit une augmentation du stress oxydatif. Le traitement par anti-TNF $\alpha$  s'accompagne d'une diminution des signes de toxicité. De plus, l'inactivation des cellules de Kupffer, principales sécrétrices de TNF $\alpha$ , occasionne également une atténuation de la toxicité du paracétamol. Mais des expérimentations contradictoires font actuellement envisager le rôle des cellules de Kupffer comme celui de régulateur des systèmes de l'inflammation, avec une mise en jeu dans la réparation cellulaire (Ju C., Reilly T.P., Bourdi M. et Al.,2002).

Des expériences comparables ont visé à explorer le rôle de l'interféron  $\gamma$ . Par exemple, des souris sauvages sont comparées à des souris *knock-out* pour l'interféron  $\gamma$ . La toxicité hépatique du paracétamol est réduite chez les souris *knock-out*, avec des taux de transaminases plus bas et des scores histopathologiques de nécrose minorés (Ishida Y., Kondo T., Ohshima T. et Al.,2002).

Par ailleurs, il est noté chez ces mêmes souris *knock-out* une diminution des transcrits messagers pour les cytokines et chémokines de l'inflammation.

L'administration d'anticorps anti-interféron  $\gamma$  donne des résultats comparables. Des travaux similaires ont été menés avec l'interleukine 10 et l'interleukine 6 chez divers modèles de souris *knock-out*, en faveur d'un rôle plutôt hépato-protecteur. Cependant, il reste difficile d'extrapoler à l'échelle de l'organisme nombre des résultats trouvés dans des conditions expérimentales bien précises car les interactions sont complexes. Pour preuve, l'étude de Cover compare deux souches de souris aux profils immunitaires très différents, plutôt pro-inflammatoire pour l'un et antiinflammatoire pour l'autre (Cover C., Liu J., Farhood A. et Al.,2006).

L'analyse histopathologique et les taux de biomarqueurs d'hépatotoxicité diffèrent peu, et il semblerait que la modification de l'équilibre cytokinique par l'intoxication au paracétamol ne puisse être ramenée à une seule cytokine qui serait médiatrice de tous les phénomènes de toxicité observés.

Le MIP2 (*macrophage inhibition protein 2*) est un prototype de chémokines produit par de nombreuses cellules en réponse aux cytokines pro-inflammatoires telles TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (Hogaboam C.M., Bone-Larson C.L., Steinhauer M.L. et Al.,1999). Le pic de sécrétion de cette chémokine est interprété comme un facteur hépato-protecteur contemporain de l'accumulation de polynucléaires neutrophiles qui suit le développement de la toxicité clinique chez la souris. Son intervention conditionnerait la mise en jeu des phénomènes de régénération hépatocytaire. Son équivalent humain, l'IL-8, est lui aussi augmenté chez le patient présentant des signes d'hépatotoxicité, et pourrait être interprété comme un marqueur d'atteinte hépatique selon certains auteurs (James L.P., Farrar H.C., Darville T.L. et Al.,2001).

Finalement, Reilly évoque en 2001 un dernier mécanisme potentiellement responsable des modifications de l'homéostasie immunitaire induite par l'intoxication au paracétamol (Reilly T.P., Brady J.N., Marchick M.R. et Al.,2001). La COX2 est induite chez la souris lors de l'intoxication au paracétamol. Chez les souris *knock-out* pour la COX2, on remarque une majoration de la toxicité du paracétamol en comparaison des souris sauvages. De même, le traitement par celecoxib, un inhibiteur des COX2, est un facteur favorisant l'apparition de l'hépatotoxicité au paracétamol. Reilly avance donc sur ces arguments l'hypothèse d'une implication de la COX 2 dans la régulation des

réactions pro- et anti-inflammatoires qui accompagnent les intoxications au paracétamol.

## 2.6 Mécanismes de réparation cellulaire :

L'atteinte hépatique induite par le paracétamol enclenche une série d'interactions visant à restaurer l'homéostasie hépatique par prolifération hépatocytaire. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, pro-mitotiques *in vivo* et *in vitro*, sont à l'origine de l'entrée de l'hépatocyte dans le cycle cellulaire vers la phase dite G1. L'administration d'anti-TNF- $\alpha$  à des rats ayant subi une hépatectomie partielle se traduit par une diminution de la synthèse d'ADN et globalement d'une diminution des signaux intracellulaires impliqués dans la régénération hépatocytaire.

Le TNF- $\alpha$  régule les taux d'IL qui, en activant une chaîne de facteurs de transduction, mettent en route les mécanismes de réparation cellulaire. Les souris knock-out pour l'IL-6 ont des taux de régénération cellulaire significativement plus bas que les souris témoins, alors que l'adjonction d'IL-6 restaure les facultés de réparation cellulaire.

Autre agent impliqué, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), exprimé au niveau de l'endothélium, possède un rôle central dans la signalisation du renouvellement cellulaire. Le récepteur VEGFR2 possède des propriétés pro-angiogéniques et le récepteur VEGFR1 des propriétés pro-mitotiques, en orchestrant les interactions entre endothélium et hépatocytes. *In vitro*, l'activation de VEGFR1 provoque le relargage de mitogènes endothéliaux comme le facteur de croissance hépatocytaire et l'IL-6 (LeCouter J., Moritz D.R., Li B., et Al.,2003). Après intoxication au paracétamol, les taux de VEGF mesurés chez les rongeurs sont très élevés et conditionnent la restauration de l'homéostasie hépatique. Le traitement par VEGF provoque une diminution des taux de transaminases mesurées après intoxication jusqu'aux trente sixièmes heures après ingestion et réduit la survenue de nécrose (Donahower B., McCullough S., Kurten R. et Al.,2006). Cette administration de VEGF occasionne une augmentation de l'expression nucléaire de gènes de prolifération cellulaire, à distance du pic de toxicité du paracétamol. Cependant, l'implication du VEGF dans les altérations de la microcirculation hépatique demeure en cours d'exploration, sous-tendue par d'éventuelles perspectives thérapeutiques à la phase tardive d'une intoxication par le paracétamol.

## 3. Facteur de risque d'hépatotoxicité :

### 3.1 Généralité sur les hépatites médicamenteuse :

Les atteintes biologiques hépatiques sont décrites pour de nombreux traitements et regroupées dans la littérature sous l'acronyme de DILI, pour *Drug Induced Liver Injury*. L'objectif du recensement et de l'étude de ces DILI est à terme de guider le praticien dans la poursuite du traitement, plutôt qu'interrompre une thérapeutique utile sans pré-requis rationnel. Les manifestations biologiques de l'intoxication au paracétamol, allant de la cytolysse *a minima* à l'insuffisance hépatocellulaire aiguë, impliquent de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. Les risques couramment admis dans la littérature concernant les hépatites médicamenteuses en général sont les antécédents de réaction à la drogue incriminée, les âges extrêmes de la vie, la polymédication, l'immunodépression (HIV), la dénutrition et l'insuffisance hépatocellulaire préexistante (Watkins P.B., Seeff L.B. ,2006). De plus, les interactions médicamenteuses sont souvent incriminées et difficiles à identifier de façon exhaustive dans la prise en charge du patient.

Concernant le paracétamol, son profil pharmacologique est pour beaucoup celui d'une drogue dotée d'une bonne tolérance Clinique biologique. Cependant, de nombreux cas cliniques et certaines études prospectives font état de cytolyses infra-cliniques ou de véritables insuffisances hépato-cellulaires chez des patients présentant des facteurs de risques et traités à dose thérapeutique. Dans deux études récentes, des doses ingérées de paracétamol inférieures à 4 grammes par jour sont rapportées chez 7 à 17,5% des patients hospitalisés pour insuffisance hépato-cellulaire aiguë (Ostapowicz G., Fontana R.J., Schiødt F.V. et Al.,2002).

Certains auteurs proposent donc empiriquement de limiter la dose quotidienne à 2 grammes (Zimmerman H.J., Maddrey W.C. Acetaminophen.,1995). Aussi, il convient de déterminer avant traitement ces facteurs qui, combinés, affectent la susceptibilité métabolique individuelle au paracétamol.

### 3.2 Facteurs de risque d'hépatotoxicité au paracétamol :

#### 3.2.1 Jeûne et dénutrition :

En cas de jeûne prolongé ou de dénutrition, les réserves en glutathion sont progressivement épuisées. De plus, la diète provoque une diminution des réserves hépatocytaires en hydrates de carbone qui sont nécessaires aux processus de sulfo-

et glucuronoconjugaison. Le métabolisme du paracétamol est donc théoriquement dévié vers l'oxydation par le cytochrome P450 2E1, majorant les concentrations en NAPQI (Whitcomb D.C., Block G.D.,1994). En situation clinique, chez l'homme, l'étude pharmacologique de Slattery montre que des prises faibles de paracétamol, allant de 500 milligrammes à 3 grammes, sont suffisantes pour amoindrir les stocks hépatiques de glutathion jusqu'à 40% (Slattery J.T., Wilson J.M., Kalthorn T.F. et Al.,1987).

Ces données sont pondérées par Schenker qui s'attache à observer les conséquences métaboliques du jeûne lors de la prise isolée de 2 grammes de paracétamol (Schenker S., Speeg K.V. Jr, Perez A. et Al.,2001).

La comparaison des métabolites avant et après jeûne n'est pas significativement différente, alors même que cette étude a été menée dans une population obèse, pour qui la toxicité est théoriquement favorisée par l'induction du CYP2E1. Les conclusions de l'article de Schenker sont cependant difficilement extrapolables à la prise répétée de paracétamol, situation plus fréquente en pratique clinique.

La publication de Whitcombs en 1994 confirme dans une revue de la littérature que le jeûne est probablement un facteur prédisposant à la toxicité du paracétamol absorbé à dose supra-thérapeutique (Whitcomb D.C., Block G.D.,1994). Il interviendrait possiblement comme facteur de risque combiné, la dénutrition étant par exemple fréquemment retrouvée dans la population éthylique chronique.

### **3.2.2 Grossesse :**

Larrey évoque la grossesse comme facteur de risque de toxicité du paracétamol sur la base d'expérimentations menées sur le modèle de la souris. En effet, les souris en gestation présentent une mortalité et un taux de nécrose hépatique supérieurs aux souris témoins. Les voies métaboliques sont déviées vers la sulfo-conjugaison aux dépens de la glucurono-conjugaison, sans incidence notable sur le taux de liaisons covalentes formées. Une des explications fournies par l'auteur réside dans la diminution et la plus lente reconstitution des taux hépatiques de glutathion chez la souris en gestation (Larrey D., Letteron P., Foliot A. et Al.,1986).

## 3.2.3 Prise chronique de paracétamol :

La prise chronique de paracétamol est susceptible d'entraîner comme le jeûne un déclin régulier et asymptomatique des réserves de glutathion hépatique. Ainsi, l'étude randomisée de Watkins a mis en évidence que 30% des patients, traités par 4 grammes par jour de paracétamol pendant 14 jours, présentaient une élévation des transaminases supérieure à 3 fois la limite supérieure de la normale (LSN) (Watkins P.B., Kaplowitz N., Slattery J.T. et Al.,2006).

Navarro et Senior suggèrent que cette cytolysse modérée traduit plus un processus adaptatif qu'une réelle atteinte hépatique, de tels phénomènes ayant été décrits temporairement lors du traitement au long cours par isoniazide, tacrine ou statine (Navarro V.J., Senior J.R.,2006).

## 3.2.4 Alcoolisme :

L'influence de la consommation alcoolique sur la toxicité hépatique du paracétamol fait débat au sein de la communauté scientifique. Les deux principaux mécanismes évoqués dans cette interaction sont d'une part l'induction des cytochromes par l'alcool, et d'autre part la déplétion mitochondriale en glutathion (Louvet A., Boitard J., Dharancy S. et Al.,2006).

L'alcool et le paracétamol partagent la même voie métabolique d'oxydation microsomale au sein du tissu hépatique. L'éthanol est oxydé par l'alcool déshydrogénase pour former l'acétaldéhyde, ou métabolisé par la voie microsomale d'oxydation dont l'enzyme clé est le cytochrome P450 2E1. Or ce dernier est inductible par la consommation chronique d'alcool chez l'homme comme chez l'animal par deux mécanismes : d'une part, l'enzyme est stabilisée par son substrat et voit sa demi-vie augmentée ; d'autre part, il existe une activation transcriptionnelle du gène CYP2E1. Ainsi, l'éthylisme chronique peut provoquer une hausse de l'activité métabolique du cytochrome d'un facteur 4 à 10. Cette induction est corrélée à la quantité moyenne d'alcool ingérée et pourrait expliquer l'ascension concomitante des taux de NAPQI. Après arrêt de l'intoxication chronique à l'alcool, le taux de CYP2E1 décroît pour retrouver une activité basale en 5 jours. Sur le modèle murin d'hépatopathie alcoolique invalidée pour le gène de CYP2E1, on observe une toxicité cependant élevée du paracétamol, expliquée par l'activité compensatrice de l'isoforme 3A4 du cytochrome P450. En réalité, plusieurs cytochromes sont mis en jeu lors de cette induction enzymatique, au rang desquels les CYP2E1, CYP3A4 et possiblement

le CYP1A2. Cette induction contribue à la tolérance métabolique qui se développe chez l'alcoolique (Meskar A., Plee-Gautier E., Amet Y.,2001).

Le deuxième mécanisme invoqué est la déplétion en glutathion hépatique occasionnée par l'éthylisme chronique, qui provoque une diminution des capacités de l'organisme à neutraliser des métabolites réactifs comme le NAPQI. Ainsi, une faible dose de paracétamol, d'ordre thérapeutique, épuise rapidement les stocks de glutathion déjà amoindris par la maladie alcoolique.

Le déclin des réserves en glutathion prédomine dans le compartiment mitochondrial, vraisemblablement par inhibition du transfert du compartiment cytoplasmique vers la mitochondrie.

L'implication de l'acétaldéhyde, produit de l'oxydation Le deuxième mécanisme invoqué est la déplétion en glutathion hépatique occasionnée par l'éthylisme chronique, qui provoque une diminution des capacités de l'organisme à neutraliser des métabolites réactifs comme le NAPQI. Ainsi, une faible dose de paracétamol, d'ordre thérapeutique, épuise rapidement les stocks de glutathion déjà amoindris par la maladie alcoolique. Le déclin des réserves en glutathion prédomine dans le compartiment mitochondrial, vraisemblablement par inhibition du transfert du compartiment cytoplasmique vers la mitochondrie. L'implication de l'acétaldéhyde, produit de l'oxydation de l'éthanol, est aussi avancée par Lluís, par modification des rapports lipidiques de la membrane interne de l'organite (Lluís J.M., Colell A., García-Ruiz C. et Al.,2003).

A l'inverse, l'intoxication éthylique aiguë met en jeu une inhibition compétitive entre paracétamol et alcool au niveau du CYP2E1 empêchant l'oxydation du paracétamol en NAPQI. Expérimentalement, chez l'animal alcoolisé de façon chronique, l'administration concomitante et aiguë de paracétamol et d'alcool réduit la formation de NAPQI. Il en résulte une épargne du taux de glutathion réduit hépatique et une diminution de la formation de liaisons covalentes entre paracétamol et protéines hépatiques, en comparaison de la prise chronique d'alcool ou de paracétamol seule (Slattery J.T., Wilson J.M., Kalhorn T.F. et Al.,1987).

Les premières données cliniques en faveur d'une interaction entre alcool et paracétamol ont été publiées dans les années 1980 sous forme de séries de cas, abordant ce qui sera désormais dénommé « mésaventure thérapeutique » dans la littérature (Seeff L.B., Cuccherini B.A., Zimmerman H.J. et Al.,1986).

Plus tard, Zimmerman compare sa série de 67 malades éthyliques aux cas rapportés dans la littérature. Soixante pourcents des patients ont ingérés moins de 6 grammes par jour de paracétamol, soit 4 grammes de moins que la dose habituellement retenue comme pouvant occasionner des lésions hépatiques (Zimmerman H.J., Maddrey W.C. Acetaminophen.,1995).

L'histologie, disponible dans certains cas, révélait des atteintes typiques à type de nécrose Centro lobulaire. La mortalité, élevée dans le groupe paracétamol pour des doses proches des posologies thérapeutiques, fait conclure à l'auteur une toxicité exacerbée du paracétamol chez l'éthylique chronique.

Par la suite, Schmidt réalise en 2002 une analyse multivariée sur 645 patients victimes d'intoxication aiguë au paracétamol (Schmidt L.E., Dalhoff K., Poulsen H.E.,2002). L'atteinte hépatique s'avère plus grave chez le buveur excessif et l'éthylisme chronique apparaît comme un facteur de risque indépendant de mortalité avec un *odds ratio* à 3,52 (intervalle de confiance 1,78-6,97). A l'inverse, la prise aiguë d'alcool est un facteur indépendant protecteur avec un *odds ratio* à 0,08 (intervalle de confiance 0,01-0,66) lorsqu'elle survient chez l'éthylique chronique, compensant ainsi le sur risque occasionné par l'intoxication éthylique au long cours.

Plusieurs études randomisées, menées en double aveugle, contrôlées contre placebo, ont été publiées dans les années 2000 pour tenter de répondre aux questionnements sur l'existence d'une toxicité conjointe de l'alcool et du paracétamol à dose thérapeutique. La publication de Kuffner porte sur 201 patients à l'entrée en cure de sevrage, au moment où les réserves en glutathion sont encore basses (Kuffner E.K., Dart R.C., Bogdan G.M. et Al.,2001). Il n'est pas retrouvé de modification du bilan hépatique au 2ème ni au 4ème jour après 48 heures de traitement par paracétamol à 4 grammes par jour. En 2007, cet auteur publie une étude comparable tant dans la forme que les résultats chez 443 patients bénéficiant de 72 heures de traitement (Kuffner E.K., Green J.L., Bogdan G.M. et Al.,2007). Bartels confirme ces résultats pour une durée de 4 jours (Bartels S., Sivilotti M., Crosby D. et Al.,2008). Pour un traitement s'étendant sur 5 jours, Dart retrouve une faible -quoique significative- élévation des transaminases de 48 à 62 UI/L dans le groupe paracétamol, contre 47 à 49 UI/L dans le groupe placebo, en l'absence de tout signe clinique. A partir de ces données, il conclue à la sécurité de l'emploi du paracétamol à dose thérapeutique chez l'alcoolique.

Ces études sont critiquables essentiellement pour l'inadéquation de la fenêtre de mesure des variations des transaminases. En effet, la cinétique des ALAT montre un pic entre le 4ème et le 5ème jour, or les mesures réalisées ici jusqu'au 5ème jour ne prennent donc pas en compte la toxicité de la dose cumulée de traitement (Rumack B.H.,2004). L'étude de Heard, toujours randomisée contrôlée contre placebo en double aveugle, porte sur 150 patients traités à 4 grammes par jour pendant 10 jours chez ces buveurs dits modérés (jusqu'à 3 verres d'alcool par jour). L'analyse statistique met en évidence une ascension moyenne et asymptomatique des transaminases de 8,7 UI/L au 11ème jour (Heard K., Green J.L., Bailey J.E. et Al.,2007).

A partir de l'ensemble de ces données, et compte tenu de la complexité des interactions (induction enzymatique, compétition) entre alcool et paracétamol, il n'existe actuellement aucune recommandation claire en France. On sait que ces interactions sont favorisées par l'association fréquente entre dénutrition et alcoolisme.

### **3.2.5 Hépatopathie d'origine virale et alcoolique :**

L'utilisation de paracétamol chez le patient souffrant d'une maladie hépatique chronique ou aiguë fait l'objet de restrictions. Le socle physiopathologique de ces limitations de dose est constitué en premier lieu d'une augmentation de la demi-vie du paracétamol chez l'insuffisant hépatique. Ainsi, plusieurs études pointent des demi-vies majorées à plus de 150%. Le contenu hépatique en CYP450 est par ailleurs inchangé ou diminué dans les atteintes hépatiques sévères.

Les taux de glutathion plasmatiques, corrélés aux taux hépatiques, sont diminués qu'il s'agisse d'hépatite virale aiguë, chronique, de cirrhose ou d'hépatites alcooliques non cirrhotiques. Barbaro fait les mêmes constatations en 1996 chez des patients porteurs d'hépatite C chronique avec ou sans co-infection avec le HIV (Barbaro G., Di Lorenzo G., Soldini M. et Al.,1996). A partir de biopsies hépatiques, la mesure du taux de glutathion semble plus basse que la norme mais ces données sont controversées (Siegers C.P., Bossen K.H., Younes M. et Al.,1982).

Les résultats discordants sont nombreux dans ces études qui portent sur des profils de patients assez divers. Forrest par exemple ne met pas en évidence de différence significative des métabolites conjugués entre sujet sain et porteur d'une

hépatopathie, suggérant des capacités de détoxification préservées (Forrest J.A., Adriaenssens P., Finlayson N.D. et Al.,1979).

Par ailleurs, une étude portant sur l'administration de 4 grammes quotidiens à 20 patients souffrant d'hépatopathie chronique ne révèle aucun cas de toxicité. Lors d'hépatites C chroniques, le résumé de Dargère ne retrouve pas d'élévation des transaminases imputable au paracétamol à 3 grammes par jour durant 7 jours (Dargère S., Collet T., Crampon D.,2000). Ces données sont corroborées par la pratique clinique, le paracétamol étant fréquemment utilisé pour traiter le syndrome grippal provoqué par l'interféron dans le traitement des hépatites B et C. L'étude de Polson, rétrospective, alimente la controverse puisque 38% des 26 patients hospitalisés pour hépatite aiguë virale A ou B ont des taux de paracétamol détectables. Les moyennes des taux de transaminases, l'INR et la mortalité sont significativement plus élevés en comparaison du groupe sans paracétamol (Polson J., Ocama P., Larson A. et Al.,2003).

Ainsi, le paracétamol serait un cofacteur impliqué dans au moins 20% des défaillances hépatiques secondaires à une hépatite virale. La fréquence d'administration à la phase clinique initiale rend difficile la distinction entre réalité et biais de la méthode utilisée.

### 3.2.6 Le tabagisme :

L'influence du tabagisme est évoquée, la fumée du tabac étant chargée d'inducteurs du cytochrome P450 2E1 comme les nitrosamines. Très peu d'études ont cependant été réalisées pour tester son implication. Sur le modèle murin, les inducteurs de ce cytochrome comme le benzothiazone, mimant les conditions tabagiques, augmentent considérablement le risque de nécrose hépatocytaire au paracétamol (Seo K.W., Park M., Kim J.G. et Al.,2000). Bien que l'effet soit supposé minimal à dose thérapeutique, Schmidt rapporte qu'en condition d'intoxication, le tabac intervient comme facteur indépendant dans le développement de l'hépatotoxicité avec un *odds ratio* de 2,68 (intervalle de confiance 1,28-5,62) et dans la mortalité avec un *odds ratio* à 3,64 (intervalle de confiance 1,23-10,75). Cette étude rétrospective réalisée auprès de 602 patients, la seule sur le sujet, souligne l'influence du tabagisme chronique sur la toxicité du paracétamol.

**3.2.7 Variations interindividuelles :**

De fortes variations du métabolisme du paracétamol ont été décrites selon les individus et selon les ethnies. Les mécanismes évoqués sont essentiellement les variations des réserves en glutathion, de l'activité du CYP 2E1 et les divers phénotypes de glucurono-conjugaison. Ainsi, Crichtley étudie les métabolites urinaires du paracétamol après ingestion d'une dose de 1,5 gramme chez des Ecossais, des Ghanéens et des Kényans (Crichtley J.A., Nimmo G.R., Gregson C.A. et Al.,1986). Les variations inter-ethniques observées sont de l'ordre d'un facteur 3 à 6 selon la voie étudiée, voie du NAPQI ou voies des conjugaisons. Les données sont possiblement influencées par des facteurs environnementaux et génétiques. Ces observations sont confirmées par Yin lorsqu'il compare les paramètres pharmacocinétiques du métabolisme du paracétamol chez des Chinois de Hong-Kong aux données de la littérature : la demi-vie est allongée et la clairance de la voie orale plus basse (Yin O.Q., Tomlinson B., Chow A.H. et Al.,2001).

Le paracétamol est principalement métabolisé par glucuroconjugaison grâce à l'UDP-glucuronyl-transférase (UGT) et accessoirement par sulfonoconjugaison via la sulfo-transférase (SULT). Trois différentes isoformes d'UGT concourent à la glucurono-conjugaison : l'UGT de forte affinité UGT1A6, d'affinité intermédiaire 1A1 et de faible affinité 1A9. Ainsi des variations de l'ordre d'un facteur 15 sont observées entre les activités des différentes isoformes de l'UDP-glucuronyl-transférase microsomale. La sulfo-conjugaison est assurée par la SULT1A6 de forte affinité. L'ensemble des enzymes de conjugaison et les cytochromes sont régulés par de nombreux facteurs de transcription, dont les récepteurs nucléaires aux xénobiotiques. Une caractéristique de toutes les enzymes de conjugaison est leur capacité à être induites par la réponse anti-oxydante occasionnée par certains facteurs de transcription comme NFR-2. Or sur des souris *knock-out* pour NFR-2, on note une susceptibilité accrue à la toxicité du paracétamol, avec une expression réduite des UGT, des SULT et de la glutathion S transférase. Le polymorphisme des gènes codant pour ces protéines pourrait expliquer les différences de susceptibilité individuelle à la toxicité (Watkins P.B., Seeff L.B.,2006).

Les différents génotypes des CYP2E1 peuvent occasionner d'importantes variations dans développement d'une défaillance hépatique. Ainsi, Ueshima rapporte des différences conséquentes en termes de demi-vie selon le

polymorphisme de CYP2E1 (Ueshima Y., Tsutsumi M., Takase S. et Al.,1996). Une mutation en particulier, localisée dans la partie 5' régulatrice du gène, pourrait affecter la régulation transcriptionnelle et majorer l'activité enzymatique.

Ces constatations sont illustrées par Grieco à partir de deux cas d'hépatotoxicité à dose thérapeutique chez des patients sans comorbidité ni facteur de risque, en particulier non alcooliques (Grieco A., Miele L., Forgione A. et Al.,2008). L'analyse étiologique, basée sur des tests métaboliques à l'antipyrine réalisés à distance, est en faveur d'une hyperactivité constitutionnelle du système oxydatif dépendant des cytochromes P450. Il est désormais acquis que les variations interindividuelles d'expression et d'activité fonctionnelle des cytochromes existent. Certains polymorphismes génétiques sont désormais établis mais la traduction phénotypique reste difficile à préciser, l'influence de cofacteurs comme le régime alimentaire, l'alcool, l'obésité ou le diabète modulant l'expression de CYP2E1. Par ailleurs, l'existence de différents phénotypes de glucurono-conjugaison rend l'hépatotoxicité difficilement prévisible.

### **3.2.8 Interactions médicamenteuses :**

De multiples drogues interagissent avec le métabolisme du paracétamol. L'UDP-transférase est ainsi inhibée par les antiépileptiques, comme le décrit Kotrubsky en 2005 (Kostrubsky S.E., Sinclair J.F., Strom S.C. et Al.,2005). Plusieurs cas rapportés d'hépatotoxicité pourraient être consécutifs à la baisse de la synthèse protéique de glucuronyl-transférase par le phénobarbital et la phénytoïne. La cytolyse mesurée est corrélée à l'inhibition directe de la glucurono-conjugaison, qui oriente une importante proportion du métabolisme du paracétamol vers la voie de CYP2E1 et du NAPQI. Parmi les autres antiépileptiques mis en cause, on compte aussi l'acide valproïque et la carbamazépine. D'autres traitements comme la zidovudine ou le triméthoprime-sulfaméthoxazole pourraient potentialiser la toxicité du paracétamol par compétition avec la voie de la glucuronoconjugaison. Par ailleurs, la ranitidine, le propranolol et le cisapride inhiberaient les réactions de glucuronoconjugaison, tandis que les œstrogènes les favoriseraient.

La voie microsomale d'oxydation du paracétamol, médiée par CYP2E1, est empruntée par de nombreux autres xénobiotiques comme la caféine, la dapsonne, les agents anesthésiques halogénés (enflurane, sévoflurane et halothane), et certains solvants organiques (acétone, benzène, chloroforme, trichloréthylène). La multiplicité des substrats dans cette voie inductible provoque des interactions

pharmacocinétiques. Par exemple, l'isoniazide et le pyrazole sont des inducteurs du CYP2E1.

Le CYP3A4, voie d'oxydation annexe du paracétamol, interagit de même avec de nombreuses drogues, ce cytochrome étant impliqué dans le métabolisme de plus de la moitié des médicaments connus (Meskar A., Plee-Gautier E., Amet Y.,2001).

**Chapitre II :**  
**La Plante Cúrcuma**  
**Longa L**

### 1. Historique du *curcuma Longa L* :

Le *Curcuma longa L*, est une épice qui fait l'objet d'échanges commerciaux depuis tellement longtemps, qu'on ne peut déterminer avec certitude son origine. On pense cependant qu'il vient du Sud ou du Sud -Est de l'Asie, peut-être plus spécifiquement de l'Inde, d'où il se serait répandu dans toute l'Asie, de même qu'au Proche et au Moyen-Orient, il y a des milliers d'années. (Penso et al., 1986)

Il ne se trouve pas dans un état véritablement sauvage, mais il semble s'être naturalisé dans certaines régions. C'est un triploïde stérile et on pense qu'il est apparu par sélection continue et multiplication végétative d'un hybride entre le curcuma sauvage diploïde (*Curcuma aromatica* Salisb., originaire de l'Inde, du Sri Lanka et de l'est de l'Himalaya) et un autre *Curcuma* tétraploïde apparenté.

Depuis 4000 ans, le *Curcuma longa L* est important dans la culture védique, on retrouve sa trace dans des écrits sanskrits ; et dans la médecine ayurvédique (médecine holistique qui étudie empiriquement les effets de l'alimentation sur la santé). (Perry et al., 2008)

En Europe, les moines font mention de la plante, introduite par les navigateurs, dans leurs écrits dès le 6ème siècle. (Delaveau., 1987)

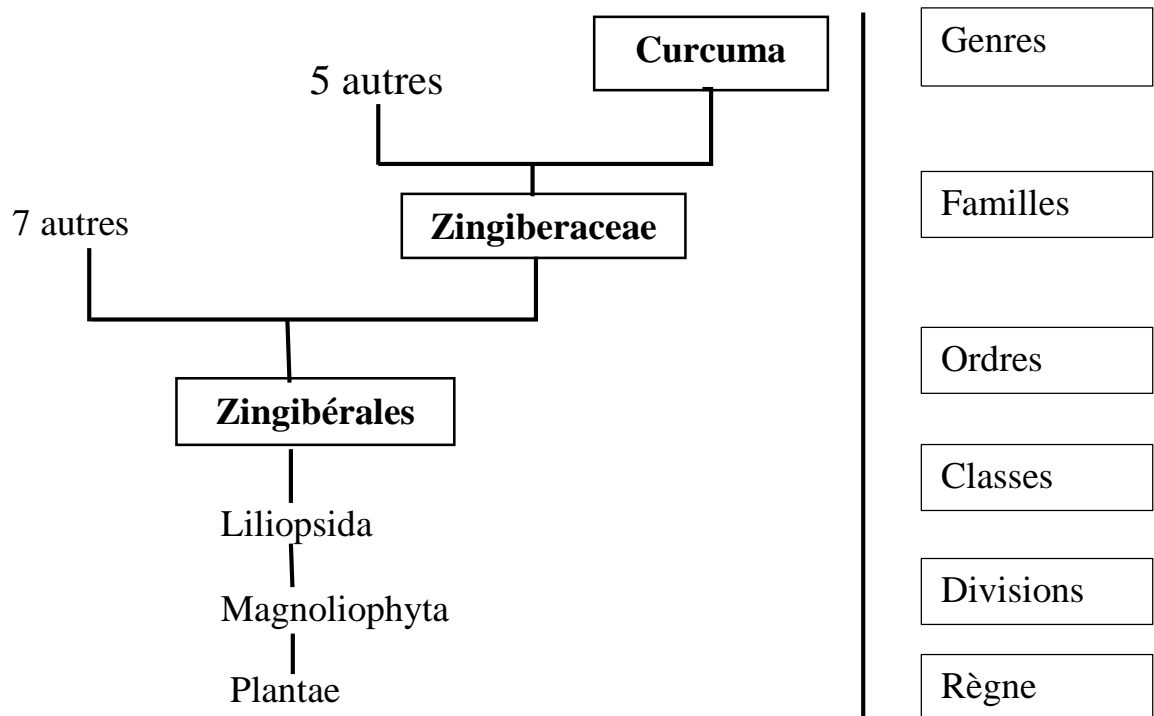
- Connu en Chine depuis le 7ème siècle.
- Connu en Afrique de l'Est depuis le 8ème siècle.
- Connu en Afrique de l'Ouest depuis le 13ème siècle.
- Ramené en Europe en 1298 par Marco Polo qui le découvre en Chine et par les arabes au 13ème siècle.

Quant à son utilisation médicinale ; Nicolas Lémery, médecin et chimiste français, estime cette *terra mérita* comme « apéritive, capable de lever les obstructions du foie, de la ratte, pour la jaunisse, pour la néphrétique » dans le dictionnaire ou traité universel des drogues simples de 1716. (Delaveau., 1987)

### 2. Classification systématique :

Le genre *Curcuma*, selon la classification APG III (Angiosperms Phylogeny Group) appartient à :

- La classe des monocotylédones
- L'ordre des scitaminales ou zingibérales
- La famille des *Zingiberaceae*



**Figure 07 :** Classification phylogénétique du végétal Curcuma (Jayaprakasha et al., 2005).

On dénombre près de 80 espèces dans ce genre.

Il regroupe de nombreuses espèces ornementales, tandis que d'autres se sont démarquées par l'utilisation de leur rhizome, aux propriétés culinaires et médicinales. Parmi ces espèces, *Curcuma longa* Linné est de loin le plus utilisé et par conséquent le plus étudié, mais on retrouve également *Curcuma xanthorrhiza* Roxburgh dit *temoe lawak* et la zédoaire, décrite sous le nom de *Curcuma zedoaria* Roscoe ou *Curcuma zerumbet* Roxburgh (figure 08). (Delaveau., 1987).

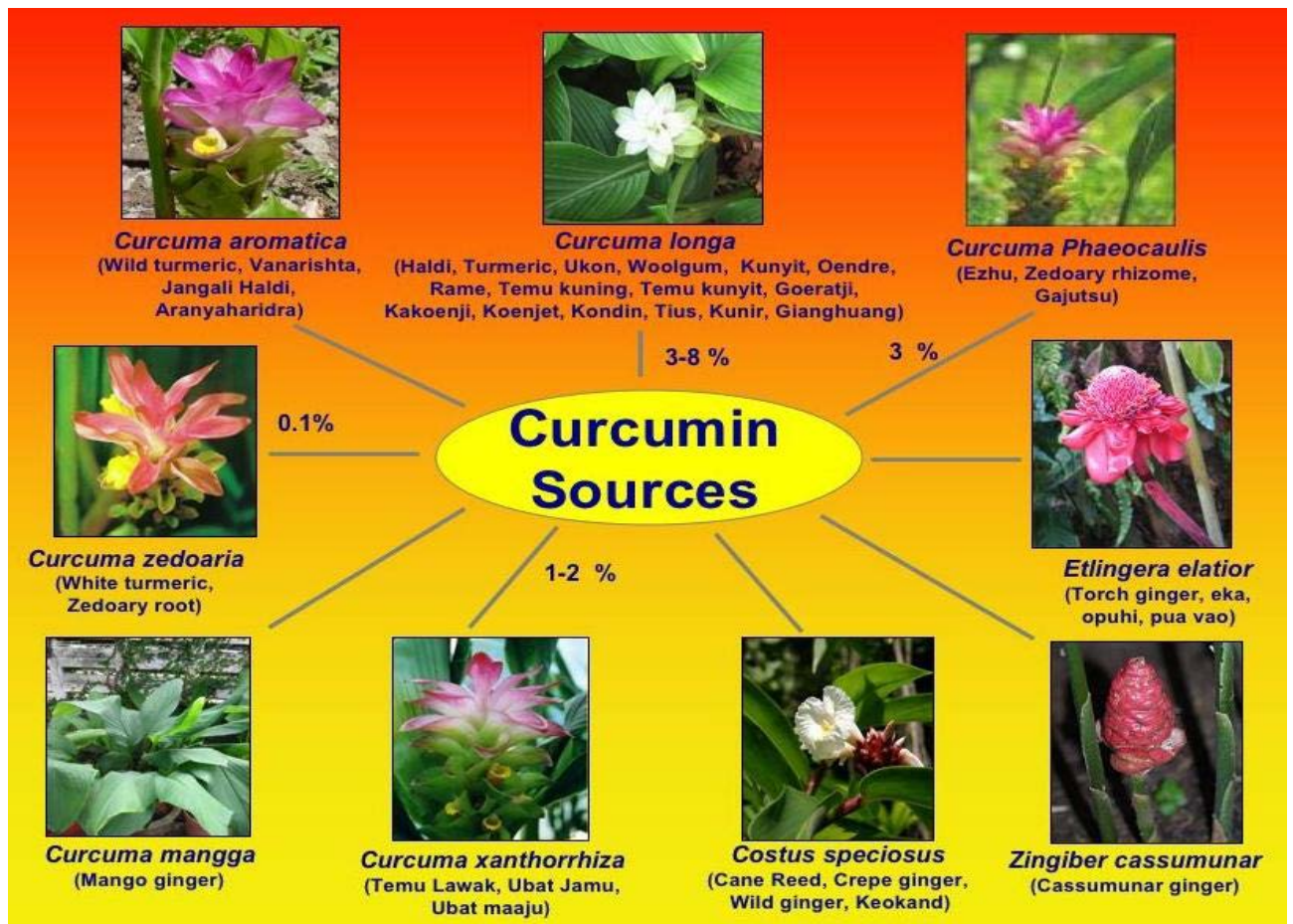


Figure 08 : Quelques espèces de *Curcuma* source de curcumine (Shishodia et al., 2005).

Sur le marché, le *Curcuma longa* L est distribué et commercialisé sous différentes appellations

- **Arabe** : الكركم (al-kourkoum).
- **Français** : rhizome de curcuma

### 3. Description de la plante :

En apparence, le *Curcuma longa* L est une plante vivace, herbacée avec une envergure pouvant atteindre un mètre

#### ❖ **Rhizome :**

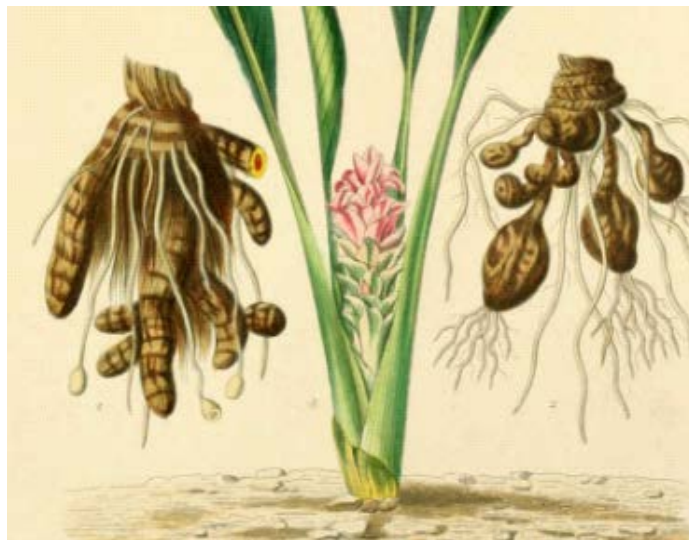
- Tubéreux et très ramifié, comestible semblable au gingembre
- La chair est jaune à orange vif à l'intérieur attribuée à la présence de curcumine avec une odeur épicée rappelant celle de la mangue.

➤ La peau est fine et brun clair

Les rhizomes principaux de forme ovoïde fournissent le curcuma rond (2,5 à 7,5 cm de longueur et 1 à 2 cm de diamètre) ; et les secondaires le curcuma long (« les doigts » qui font à leur maturité 5 à 10 cm de longs et 1 à 1,5 cm de diamètre). (Delaveau., 1987).



**Figure 09 :** Rhizomes de *Curcuma longa* L. (Boullard., 2001).



**Figure 10 :** Port de *Curcuma longa*. Souche connue sous le nom de curcuma long (en haut) et de curcuma rond (en bas). (Boullard., 2001).

### ❖ Feuille :

- Très longues, oblongues à elliptiques, engainantes, possèdent une puissante nervure axiale et des nervures secondaires parallèles

- Les gaines des feuilles forment une pseudo tige courte, les limbes sont vert foncé au-dessus, vert très clair en dessous, criblés de points translucides
- Le limbe mesure de 7 à 70 cm de long et 3 à 18 cm de large. (Boullard., 2001)



*Figure 11* : Feuilletage de *Curcuma longa* L. (Grugeau., 1995).

### ❖ Fleur :

- Tige longue, inflorescence sortant du cœur des feuilles de 12 à 20cm contenant beaucoup de fleurs.
- Couleurs de fleurs : blanche.
- Période de floraison : de mai à septembre.
- Floraison non parfumée.
- Possèdent :
  - ✓ Un calice tubulaire court présent 3 dents inégales
  - ✓ Une corolle tubulaire à sa base, puis divisée en 3 lobes jaunes inégaux
  - ✓ Un ovaire infère, triloculaire, surmonté d'un style terminé par un stigmate simple et en crochet. (Itokawa et al., 2008).



*Figure 12 : Inflorescence de curcuma longa L.*



*Figure 13 : Curcuma longa, Linné*

**4. Composition chimique :**

Pour 100 g de partie comestible, la poudre de curcuma contient approximativement :

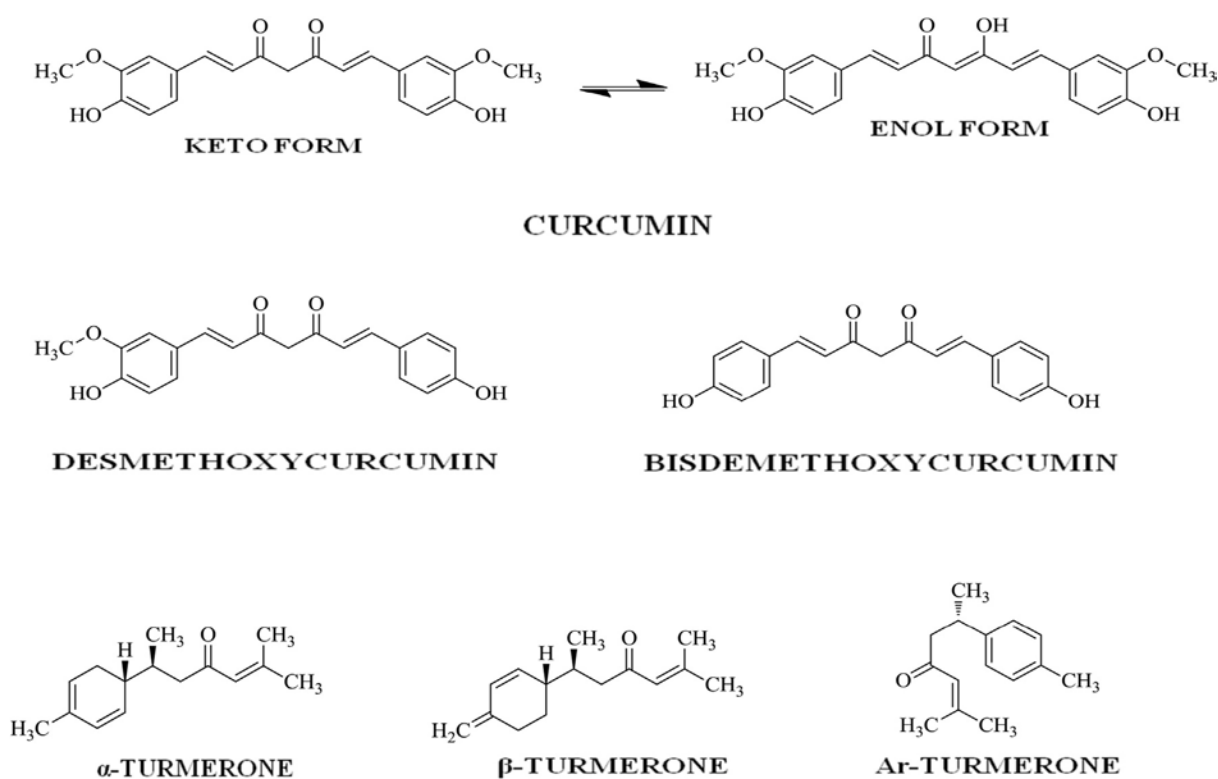
Eau	11,4 g
Energie	1481 kJ (354 kcal)
Protéines	7,8 g
Lipides	9,9 g
Glucides	64,9 g

Dont Amidon : 45 à 55% de la composition totale

Fibres alimentaires	21,1 g
Ca	183 mg
Mg	193 mg
P	268 mg
Fe	41,4 mg
Zn	4,4 mg
Vitamine A	traces
Thiamine	0,15 mg
Riboflavine	0,23 mg
Niacine	5,14 mg
Folate	39 µg
Acide ascorbique	25,9 mg

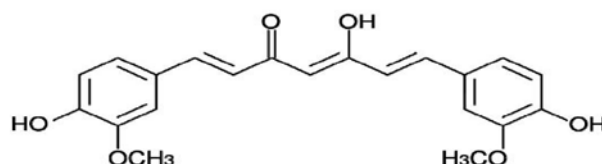
Par distillation à la vapeur d'eau, les rhizomes produisent 2 à 7% d'huile essentielle, qui est rouge orangé et légèrement fluorescente. Ses constituants principaux sont un sesquiterpène, le zingibérène (25%) et ses dérivés cétoniques : la turmérone (35%) et l'ar-turmérone (déhydroturmérone) (12%) (*figure 14*).

L'huile essentielle de curcuma se compose également en petites quantités de monoterpènes oxygénés, associés à de petites quantités de sesquiterpènes hydrocarbonés et de monoterpènes hydrocarbonés. La contribution relative de chaque composant à l'arôme et à la flaveur est mal connue. L'arôme de l'huile essentielle distillée à la vapeur est différent de celui de l'épice, ce qui serait dû, pense-t-on, à la formation d'artefacts lors de la distillation. (Jansen P.C.M., Grubben G.J.H., Cardon D.,2005)

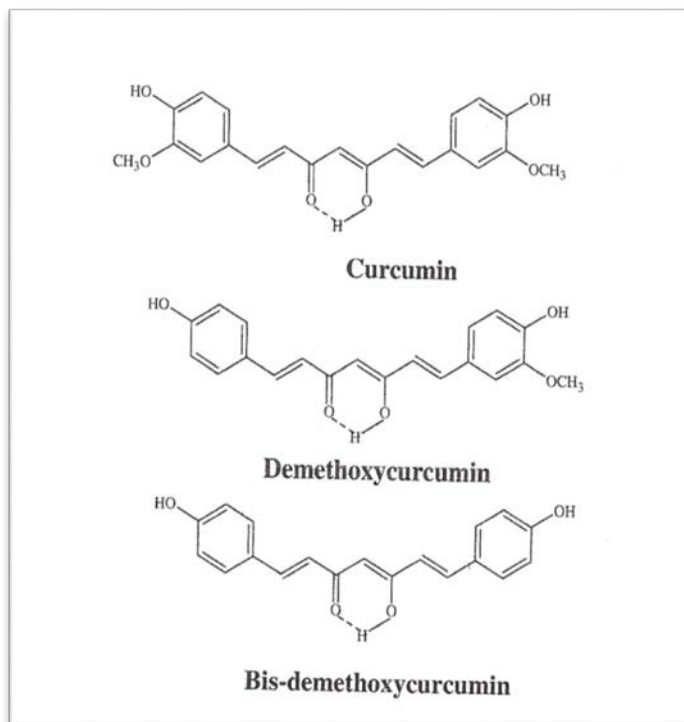


**Figure 14 :** Structures chimiques des constituants importants présents dans le curcuma. (A. Amalraj et al.2007).

L'extraction du rhizome à l'alcool éthylique, à l'acétone ou au chlorure de méthylène donne 6 à 10% d'oléorésine, qui contient 35 à 45% de curcumine (*figure 15*) et de ses dérivés, la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine, connues sous le nom collectif de curcuminoïdes (*figure 16*). Ces composés donnent au curcuma sa couleur jaune orangé si caractéristique, alors que l'huile essentielle lui confère son arôme et sa saveur typiques (Jansen P.C.M., Grubben G.J.H., Cardon D.,2005).



**Figure 15 :** Structure chimique de la curcumine :  
1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxy-phényl) hepta-1,6-diène-3,5-dione (Johanson J.J., Mukhtar H.,2005)



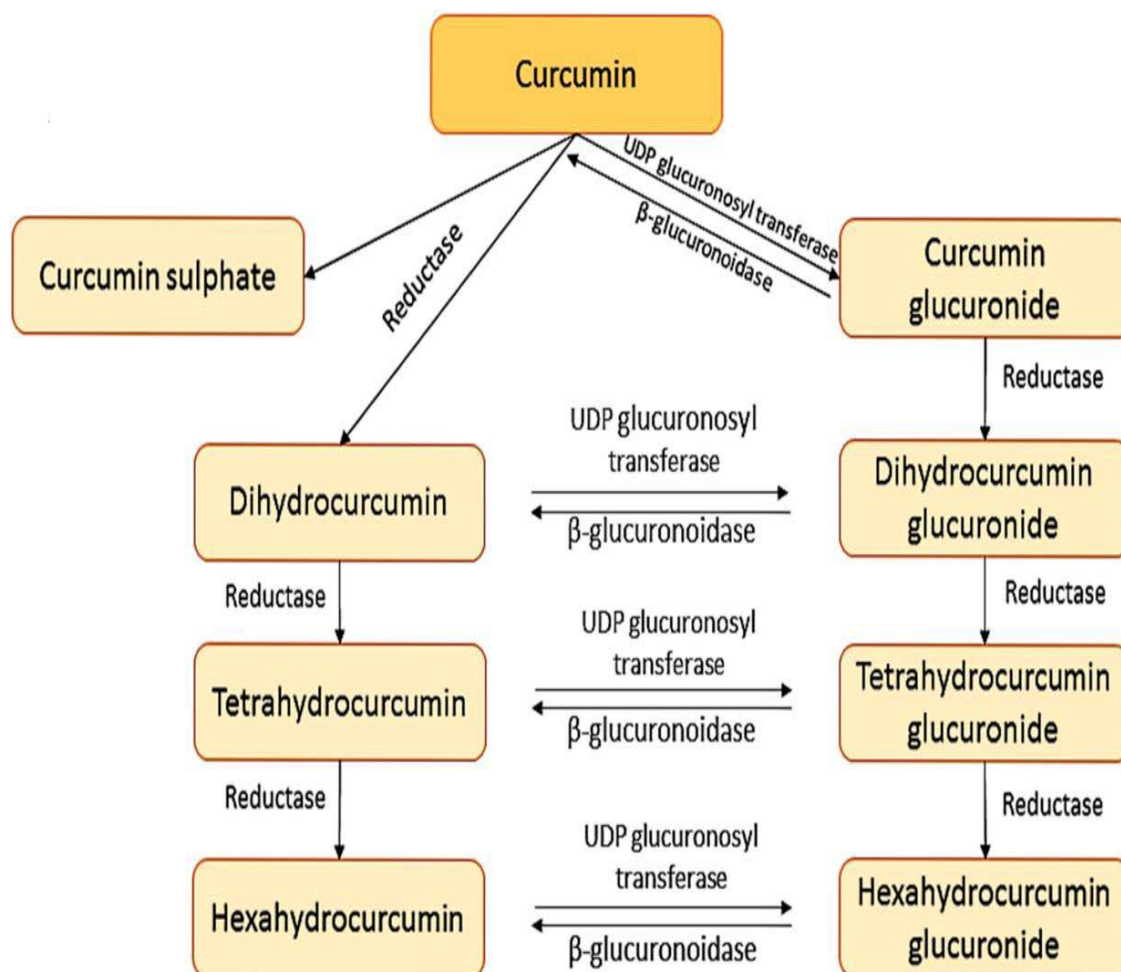
**Figure 16 :** Structure chimique des curcuminoïdes (Jayaprakasha G.K.,et al).

Le contenu des rhizomes est très variable et dépend de l'endroit où ils sont cultivés, du type de cultivar, du moment de la récolte, de la méthode de traitement et d'analyse (Jansen P.C.M., Grubben G.J.H., Cardon D.,2005).

### 5. Absorption et métabolisme de la curcumine :

La curcumine est très mal absorbée et est éliminée en grande partie dans les fèces, pour 1/3 sous forme inchangée. Administrée par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, son élimination dans la bile sous forme native et de dérivé glucuronoconjugué est rapide ; puis elle suit un cycle entéro hépatique. La curcumine a donc une faible biodisponibilité avec une absorption très limitée et un fort effet de premier passage hépatique et intestinal. Néanmoins, il a été montré que la pipérine, un alcaloïde naturel du poivre, permet de multiplier par 20 l'absorption de la curcumine en inhibant les processus de métabolisation (glucuronidation) et d'élimination cellulaire. Il existe peu de données concernant la pharmacocinétique de la curcumine chez l'homme : dans un essai de phase l'utilisant un mélange de curcuminoïdes par voie orale chez des patients atteints de cancer colorectaux, une dose de 3,6 g est nécessaire pour permettre une augmentation des concentrations plasmatiques de la curcumine et de ses

métabolites conjugués sulfatés et glucuronidés (*figure 17*) suffisante pour être détectable dans le sérum. Pour des doses beaucoup plus faibles, on retrouve déjà la curcumine et ses dérivés dans l'urine, ce qui permet une surveillance simple et reproductible de la compliance des patients au « traitement ». Le pic des concentrations sériques apparaît au bout de 1 à 2 heures après administration orale puis celles-ci diminuent progressivement dans les 12 heures qui suivent (Bernard M, Couderc R, et al.,2005).



**Figure 17** : Les principaux métabolites de la curcumine (Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J et al.,2016).

Les biotransformations de la curcumine sont présentées dans la (*figure 17*). La transformation dans l'intestin et le foie peuvent conduire à générer des glucuronides curcumine et les sulfates de curcumine ou, alternativement, des molécules réduites comme hexahydrocurcumine. La curcumine subit une biotransformation lors de l'absorption intestinal à glucuronides de tétrahydrocurcumine et hexahydrocurcumine. La curcumine dans le foie est

d'abord transformée en dihydrocurcumin et tétrahydrocurcumine par les réductases et ils sont ensuite transformés en conjugués comme le monoglucuronide dihydrocurcumin-glucuronide et de la tétrahydrocurcumine-glucuronide par  $\beta$ -glucuronidase (Pulido-Moran M, et al.,2016).

### **6. Effet antioxydant préventif de la curcumine :**

La curcumine, extraite du curcuma, est un puissant antioxydant qui apporte une protection efficace contre les lésions occasionnées par les radicaux libres. En 1995, des travaux scientifiques ont montré qu'une alimentation contenant de la curcumine diminuait le stress oxydatif. Des chercheurs indiens ont montré que la curcumine inhibe la peroxydation lipidique et neutralise les radicaux superoxydes et hydroxyle. Deux autres études ont été publiées en 2000. Dans la première, les chercheurs ont montré qu'un contact prolongé des cellules endothéliales d'une aorte de bovin avec de la curcumine renforçait la résistance cellulaire aux lésions oxydatives. Dans une investigation séparée, les chercheurs ont découvert que la curcumine diminuait le stress oxydatif induit dans le foie de souris par du trichloréthylène. Ils en ont conclu que les effets bénéfiques de la curcumine semblaient dériver de sa capacité à freiner l'augmentation des niveaux cellulaires de peroxydation, un composant associé à l'utilisation de l'oxygène par les cellules. Cet antioxydant serait plus actif que la vitamine E (Matterlini R et al.,2000).

### **7. Effet hépato-protecteur de la curcumine :**

En cas d'agression hépatique, la curcumine a un rôle protecteur majeur par activation dans le foie des systèmes enzymatiques anti-oxydants : superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et transférase. (Nicol M, Maudet M.,2005).

Le rhizome de curcuma longa est utilisé dans le traitement des hépatites, de la jaunisse et du cancer du foie dans de nombreux pays d'Asie du Sud-Est. Le principe actif de la plante, la curcumine, a démontré des effets protecteurs sur différents modèles murins d'hépatotoxicité (intoxication hépatique induite par l'acétaminophène, l'aflatoxine B1, l'éthanol, paracétamol, et le tétrachlorure de carbone).

L'effet hépato-protecteur de la curcumine est dû à l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires et à l'activité antioxydante (Ghosh et al. 2011). Par ailleurs, la curcumine inhibe le développement et la progression du

cancer, en agissant sur plusieurs stades de la carcinogénèse (initiation, progression et promotion). Plusieurs essais cliniques ont été réalisés ou sont actuellement en cours pour le traitement de diverses pathologies (cancer colorectal, cancer de la vésicule biliaire, cancer du pancréas, maladie d'Alzheimer, psoriasis). Aussi, une étude de phase I chez des patients présentant des lésions précancéreuses montrent l'absence de toxicité de la molécule (Hatcher et al. 2008). L'utilisation traditionnelle de cette espèce en Asie du Sud-Est est donc appuyée par une littérature abondante sur ses activités pharmacologiques.

### **8. Effet anti-inflammatoire préventif de la curcumine :**

Le curcuma est utilisé depuis des millénaires pour traiter les affections à caractère inflammatoire. L'action anti-inflammatoire du curcuma est comparable à celle de la cortisone, de la phénylbutazone (utilisée dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde) et des anti-inflammatoires non-stéroïdiens. Il semble que le curcuma agisse en inhibant des enzymes qui participent à la synthèse des substances inflammatoires elles-mêmes dérivées de l'acide arachidonique. L'action anti-inflammatoire du Curcuma maintient le taux de cortisol à son plus bas niveau, ce qui a une action bénéfique sur le stress et sur le vieillissement prématuré des organes.

Lorsque le curcuma est associé à des acides gras essentiels, ils se potentialisent mutuellement dans leurs actions anti-inflammatoires. Contrairement à certains anti-inflammatoires de synthèse, le curcuma n'inhibe pas la prostacycline, qui est un important facteur de prévention des thromboses vasculaires. Aussi, sa grande action antioxydante joue un rôle important dans son effet antiinflammatoire. (Hervé G, Ma promesse anti âge, P 192).

# **Partie II :** **Expérimental**

# **Chapitre I:**

## **Matériels Et Méthodes**

## I. Matériel et Méthodes :

### I.1 Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé dans notre expérimentation est le curcuma longa dont le principe actif est la curcumine cette plante a été choisie pour ses effets anti-inflammatoire et protecteur contre le stress oxydatif causé par une intoxication chronique au paracétamol de 14 semaine.

### I.2 Animaux :

37 souris de (souche swiss) et de différents sexes ont été fournies par l'institut pasteur d'Alger, âgés de  $25 \pm 2$  jours avec un poids corporel moyen de  $(25 \text{ gr} \pm 5 \text{ gr})$ .

Les souris ont été élevées dans l'animalerie de l'université de Mostaganem dans des conditions optimale d'élevage ( $T^\circ$  ambiante  $=21^\circ \pm 3^\circ\text{c}$ ), exposées à une photo période journalière de 12 heures, nourries par un régime alimentaire standard (aliment à bouchon) avec une ration journalière de 18 gr /souris et l'eau de boisson et l'eau minérale.

Le calcul de l'évolution pondérale et la consommation d'eau est hebdomadaire pour chaque souris.

Après le période d'accoutumance d'environ 15 jours. Les animaux ont été répartis en 4 groupes (lots) de 9 souris chacun l'intoxication par le paracétamol et le traitement par la curcumine (Para + Cur) mg /kg ont été réalisés par gavage oral (per os) pendant 14 semaines.

- **Le lot 1** : témoin a été traité par l'eau minérale (0+0) mg/kg
- **Le lot 2** : intoxiqué par le paracétamol à une dose de 100 mg pendant 7 semaines puis augmentée à 200 mg les 7 dernières semaines.
- **Le lot 3** : traité par la curcumine à une dose de 2 g/kg
- **Le lot 4** : intoxiqué traité, les souris reçoivent au même temps les doses toxiques et le traitement (effet protecteur) soixante douze 72 heures après l'arrêt de traitement les souris ont été sacrifiées par décapitation sous légère anesthésie à la vapeur de chloroforme, après un jeûne nocturne. Ses prélèvements sanguins ont été réalisés pour les dosages sanguins des paramètres biochimiques et des enzymes marqueurs du fonctionnement hépatique.

Le foie est isolé, rincé avec l'eau physiologique et conserve dans le formol (10 %) pour servir à l'étude histologique.

### **I.3 Méthode 2 :**

Le dosage du glucose, transaminases (TGO, TGP), albuminémie et  $\gamma$ -GT est réalisé sur un automate COBAS 6000 analyser dans un laboratoire privé d'analyse médicales et exploration biologiques (Dr Houbad).

L'étude histologique est réalisée dans le laboratoire vétérinaire régionale de la wilaya de Mostaganem (Hassi Mamiche).



## I.4 Étude histologique :

Les coupes histologiques sont réalisées au niveau d'organes cibles de la toxicité par le paracétamol : foie. Une étude histologique complémentaire a été réalisée chez d'autres organes qui peuvent accumuler une source de pathologies liées à sa hépatotoxicité et sa néphrotoxicité : le rein.

### I.4.1 Fixation :

La fixation a pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du matériel dans un grand volume de Liquide fixateur.

Le fixateur le plus commun pour la photo-microscopie est le formol neutre de 10% (formaldéhyde de 4% dans le phosphate salin).

Ce processus, alors que la préservation de l'intégrité structurale des cellules et du tissu la fonctionnalité biologique des protéines en particulier des enzymes, mais peuvent également les dénaturer dans une certaine mesure. Ceci peut être nuisible à certaines techniques histologiques. Des fixateurs de Bouin est souvent employés pour la microscopie fluorescente.

### I.4.2 Déshydratation et inclusion :

Le but du traitement de tissu est enlevé l'eau des tissus et de le remplacer avec un milieu qui solidifie pour permettre aux sections minces d'être coupées. Le tissu biologique doit être soutenu dans une matrice dure pour permettre aux sections suffisamment minces d'être coupées en général 2-5  $\mu\text{m}$ . Pour la photo microscopie, le solide de paraffine est le plus fréquemment employé, puisqu'il non-miscibles avec de l'eau, le constituant principal du tissu biologique, l'eau doit d'abord être enlevé en cours de déshydratation. Des échantillons sont transférés par des bains d'éthanol de plus progressivement concentré pour enlever l'eau (60°, 70°, 80°, 90° et alcool pur). Ceci est suivi d'un agent de dégagement hydrophobe (tel que le xylène) pour éliminer l'alcool, et du solide de paraffine finalement fondu, l'agent d'infiltration qui remplace le xylène.

### I.4.3 L'inclusion :

Après que les tissus aient été déshydraté, dégagés et infiltrés avec la solution d'inclusion, ils sont prêts pour l'inclusion extérieur. Pendant ce processus. Les échantillons de tissu sont placés dans des moules avec le liquide incluant le matériel (tel que l'agar, la gélatine, ou la cire dans notre étude) qui est alors durcie. Ceci est réalisé par le refroidissement dans le cas du solide de paraffine et le chauffage (traiter) dans le cas des résines époxydes. Les blocs durcis contenant les échantillons de tissu sont alors prêts à être sectionnés.

Puisque les tissus Formaline-fixes (FFPE) et incorporés dans le paraffine peuvent être stockés indéfiniment à la température ambiante, les tissus de FFPE sont une ressource importante pour des études historiques dans la médecine.

L'inclusion peut également être accomplie en utilisant la congélation, le tissu non-fix dans un milieu à base d'eau, qui est alors gelé aux blocs durcis par forme.

### **I.4.4 Découpage :**

Pour la photo microscopique, un couteau en acier monté dans un microtome est utilisé pour couper des sections de 2 à 5 micromètre d'épaisseur de tissu, puis étaler les films sur la surface d'un bain marie (chauffé à 40 °c), ensuite on récupère les sections coupées qui sont montées sur une lame en verre de microscope, puis chauffer à l'aide d'une plaque chauffante à température 40°, enfin les mettre dans une étuve (55-60°C) facilitant le déparaffinage.

Les sections montées traitent la tache appropriée.

### **I.4.5 Colorations :**

L'hématoxyline et éosine (coloration H & E) est la tache microscopique légère la plus généralement utilisée en histologie et histopathologie. Hématoxyline, un colorant basique colore en violet le noyau due à une affinité des acides nucléiques du noyau de cellule et l'éosine, un colorant acide, teinte en rose le cytoplasme. L'acétate d'uranyle et le citrate de plomb sont généralement employés pour donner le contraste au tissu dans le microscope électronique, elle comprend plusieurs étapes :

- Imprégnation des lames dans les 3 bacs de xylène (chaque bac pendant 5min)
- Ethanol absolu 3 bac (chaque bac pendant 5min)
- Lavage avec l'eau distillée. Faire introduire les lames dans un bac contenant l'hématoxyline pendant 8 min
- Lavage avec l'eau distillée
- Les faire passer dans un bec contenant de l'alcool acide pendant 3min (ou l'alcool absolu + quelque goutte de HCL), puis laver les lames encore une autre fois dans l'eau distillée.
- Immerger les lames dans une solution ammoniacale pendant 15 sec (eau distillée + quelques gouttes d'ammoniac) suivi d'un lavage
- Faire pénétrer les lames dans un bac contenant de l'éosine suivi d'un lavage
- Les mettre ensuite dans deux bacs d'éthanol (2x5min)
- La dernière étape c'est de mettre les lames colorées dans bacs de xylène (2x5)

## I.4.6 Montage :

Le montage est utilisé pour donner le contraste au tissu aussi bien qu'accentuer les dispositifs particuliers d'intérêt. Là où les mécanismes de la chimie fondamentale de montage sont compris, y compris l'histochimie.

Les coupes colorées sont montées entre lames et lamelles avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre

## I.4.7 Observation et lecture microscopique :

Le microscope optique (ou photonique) le plus courant utilise la lumière visible.

Le tissu à étudier peut-être observé après montage afin d'évaluer certaines de leurs formes normales ou bien le anomalies cellulaires et tissulaires. L'examen microscopique est parfois effectué après adjonction de colorant qui permettent d'évaluer l'État cellulaire mis en évidence des structures l'H&E est le plus utilisée en histologie car elle colore les noyaux en couleur mauve et le cytoplasme en rose clair permettant ainsi estimer la structure cellulaire.

## I.5 Paramètre biochimique :

### I.5.1 Dosage sanguin des transaminases (ASAT/ALAT) :

La concentration de ces enzymes est exprimée en unité internationale par litre de substrat (UI/L). 1UI correspond à la quantité d'enzymes qui transforment 1 $\mu$ mol de substrat/min.

#### ➤ Principe :

#### ✓ Aspartate aminotransférase (ASAT)

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi le glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) catalyse le transfert d'un groupe aminé à partir de l'aspartate à l' $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. Ce dernier est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH,H<sup>+</sup> (Nicotinamide adénine dinucléotide) selon les réactions suivantes:



Le taux de diminution de la concentration en NADH,H<sup>+</sup> mesuré par spectrophotométrie à 340 nm, est proportionnel à l'activité catalytique de ASAT (Davila et al., 1989).

### ✓ Alanine amino transférase (ALAT)

L'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi le glutamate-pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert d'un groupe aminé à partir de l'alanine à l' $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Ce dernier est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH,H<sup>+</sup> selon les réactions suivantes:



Le taux de la diminution de la concentration en NADH,H<sup>+</sup> mesuré par spectrophotométrie à 340 nm, est proportionnel à l'activité catalytique de ALAT (Davila et al., 1989).

### ➤ Mode opératoire :

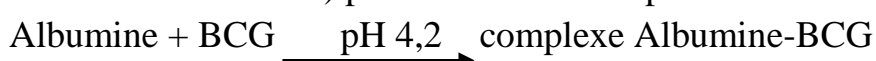
La récolte du sang a été faite dans des tubes héparines. Ces derniers ont été soumis à une centrifugation à 4000 g/5 min. Le sérum a été ensuite récupéré et utilisé pour le dosage des transaminases (ASAT et ALAT) grâce à des kits enzymatiques SPINREACT en utilisant 1000  $\mu$ l du réactif pour 100  $\mu$ l du sérum et cela pour chaque test et pour chaque échantillon. Après agitation, l'absorbance à 340 nm a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre de marque Pictus B Diatron ;

## I.5.2 Albumine :

L'albumine sert au transport de nombreuses substances (bilirubine, acides gras, calcium, médicaments...), aide au maintien de la pression oncotique et représente une réserve d'acides aminés pour la croissance des tissus. L'évaluation de l'albuminémie est utilisée dans le diagnostic et le suivi du traitement de nombreuses pathologies principalement les désordres hépatiques et rénaux ; elle permet de détecter des pertes de liquide (déshydratations) ou une malnutrition

### Principe :

Ce kit Albumine permet le dosage colorimétrique de l'albumine dans le sérum et le plasma humains. A pH 4,2, l'albumine se combine au vert de bromocrésol (Bromo Cresol Green = BCG) pour former un complexe bleu-vert :



L'intensité de la coloration du complexe est proportionnelle à la quantité d'albumine présente dans l'échantillon.

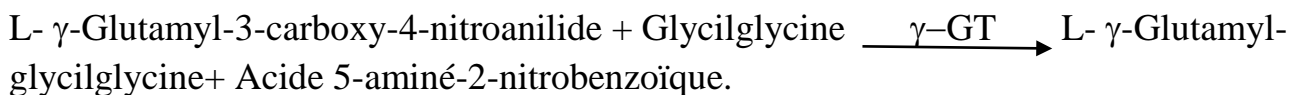
### I.5.3 La gamma-glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT) :

Bien que les reins renferment la concentration la plus élevée en  $\gamma$ -glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT), l'activité  $\gamma$ -GT mesurée dans le sérum serait presque exclusivement d'origine hépato-biliaire. Son activité est augmentée dans toutes les formes d'atteintes hépatiques. C'est plus particulièrement le cas pour les obstructions biliaires intra ou post hépatiques. Le dosage de la  $\gamma$ -GT est plus sensible que celui des Phosphatase alcaline leucocytaire (PAL) ou des transaminases pour détecter les cas d'ictère obstructif, de syndrome de cholestase ou cholécystite. Une augmentation modérée de l'activité  $\gamma$ -GT est également rencontrée dans les cas d'hépatite, d'alcoolisme chronique ou d'usage de drogues (sédatifs, anticonvulsifs, tranquillisants). Une diminution de l'activité  $\gamma$ -GT est rencontrée dans le cas d'hypothyroïdie.

#### ➤ Principe :

Méthode basée sur les travaux de Szasz, Rosalki et Tarlow.

La gamma-glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT) catalyse le transfert d'un groupe  $\gamma$ -glutamyl de la  $\gamma$ -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  $\gamma$ -GT dans l'échantillon testé (TIETZ N.W.,1999). (SZASZ G.,1974).

**I.5.4 Glycémie :**

Il s'agit d'un dosage colorimétrique à la suite de deux réactions enzymatiques couplées. Une réaction enzymatique étroitement spécifique (glucose-oxydase) oxyde le glucose présent dans l'échantillon en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier sert de substrat à la peroxydase dans une réaction couplée conduisant à l'oxydation de l'o-dianisidine en un produit coloré. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose. (SHEN., 2009).

On met 1000 µl de réactif dans le tube à essai et on ajoute 10 µl de sérum. On attende 10 min pour la réaction. A l'aide d'un spectrophotomètre UV de type SHIMADZU UV 1800, on mesure l'absorbance A de la substance colorée en solution pour la longueur d'onde  $\lambda$  (= 470 nm) (ALIS., 2003).

# **Chapitre II :**

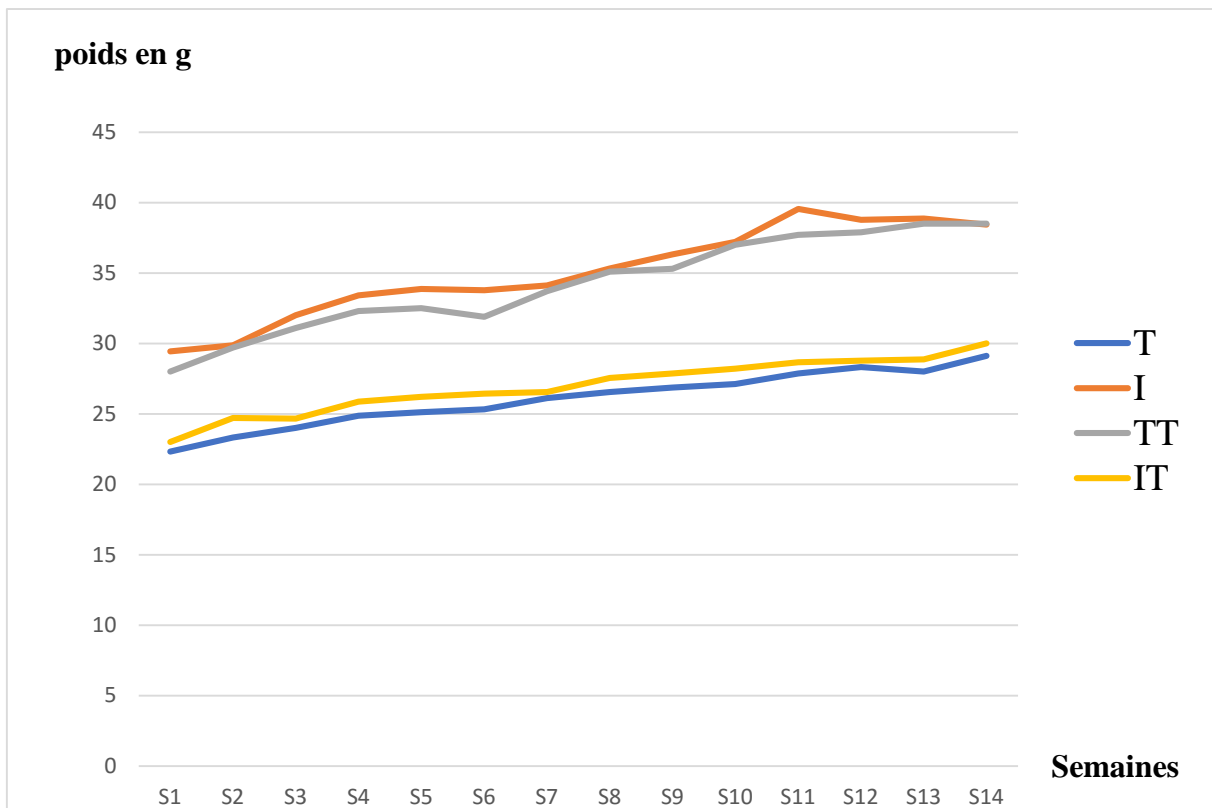
## **Résultats et discussion**

1. Résultats et discussions :

1.1 Résultats :

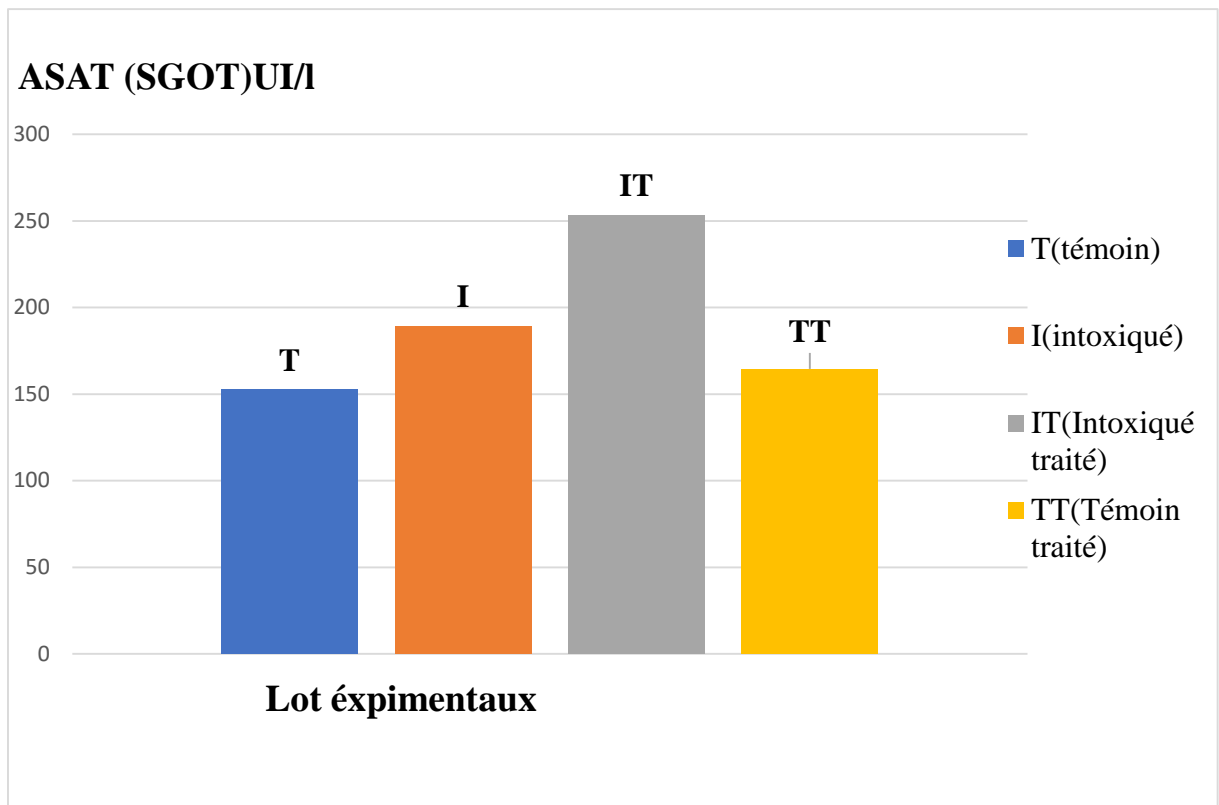
1.1.1 Evolution pondérale :

Suivant les résultats obtenus, on constate une prise de poids corporel remarquable chez les souris d'expérimentations comparées aux souris témoin (figure19).

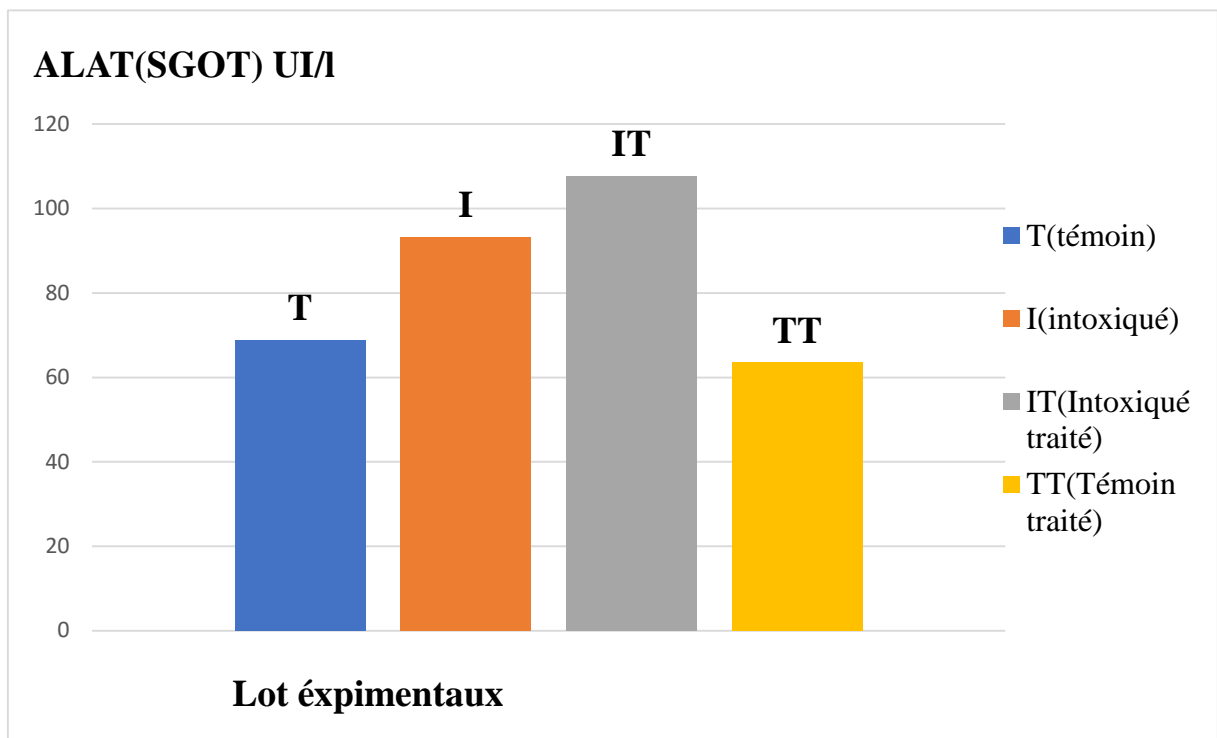


**Figure 18 :** L'évolution pondérale chez les souris intoxiquées « I » par paracétamol (100mg/kg et 200mg/kg), intoxiquées (100mg/kg et 200mg/kg) et traitées par le curcumin (2g/kg) « IT », témoins traitées « TT » par le curcumin (2g /kg) comparé aux témoins « T » durant 14 semaines d'expérimentation.

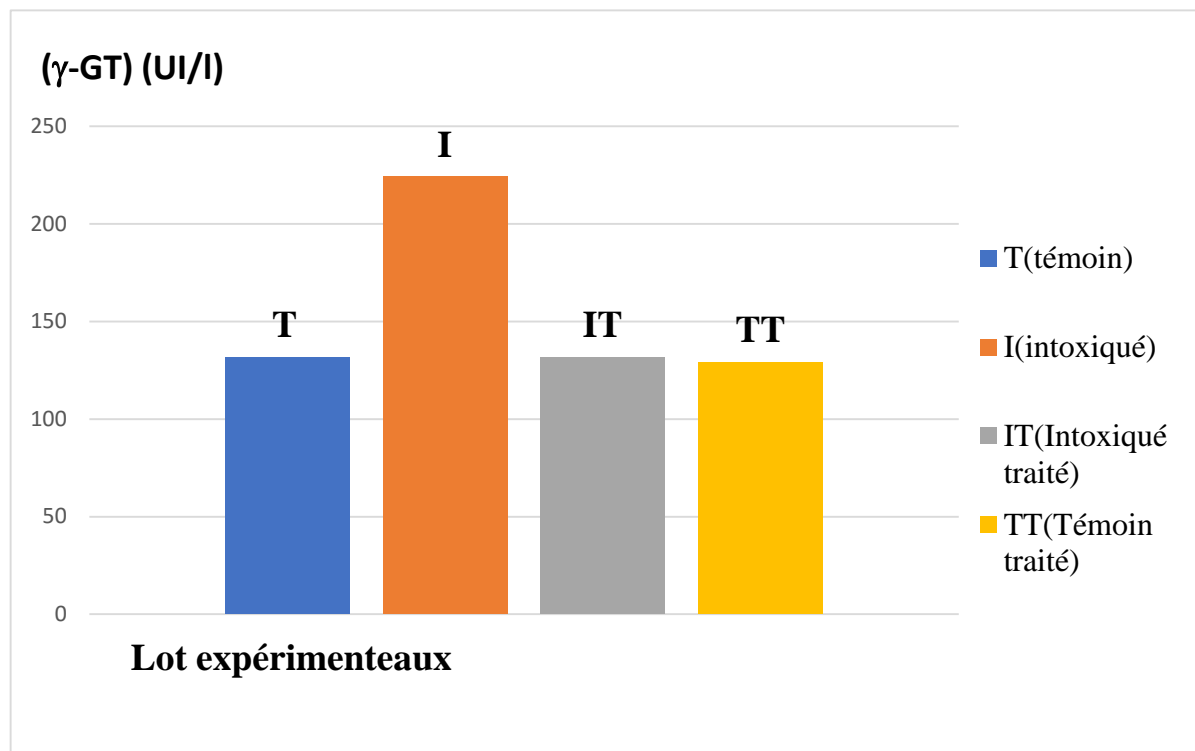
1.1.2 Résultat de l'étude biochimique :



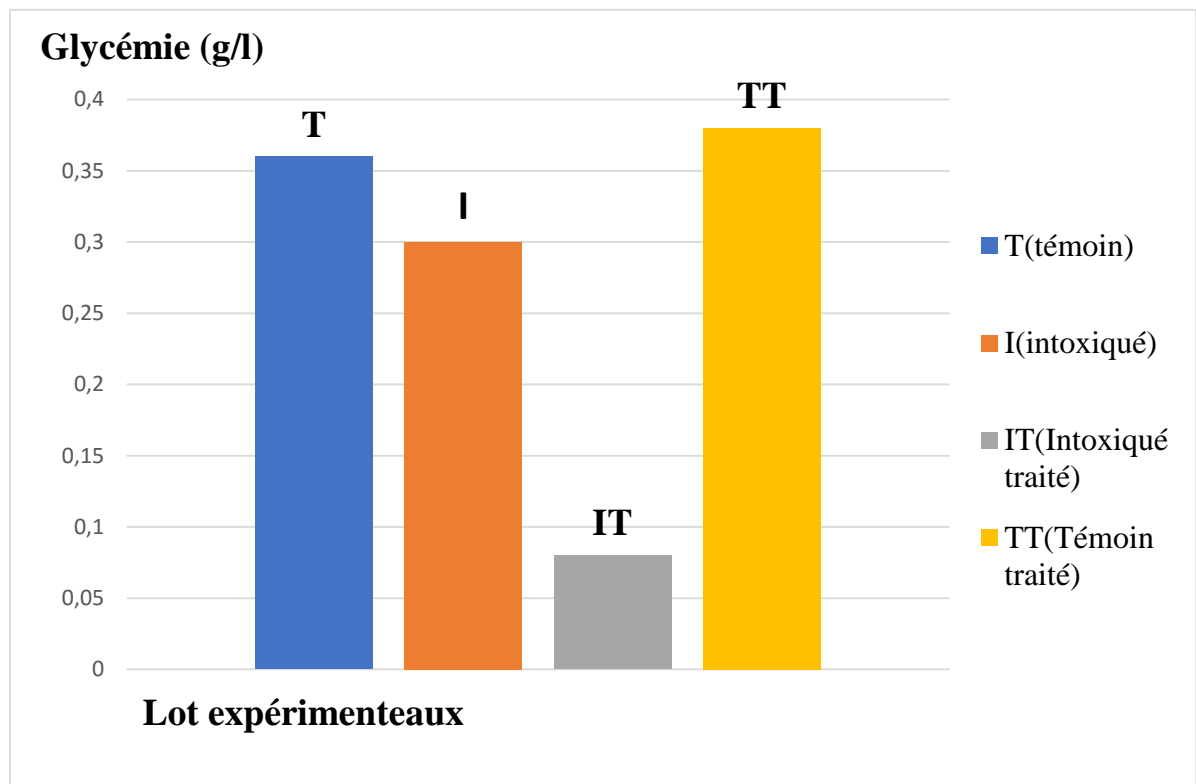
**Figure 19** : Le taux d'aspartate aminotransférase (ASAT) (UI/l) chez les souris intoxiquées (I) par paracétamol (100mg/g) et (200mg/kg), intoxiquées et traitées (IT) par le curcumin (2g/kg), témoin traitées (TT) par le curcumin (2g/kg) comparées aux témoins (T) durant 14 semaines



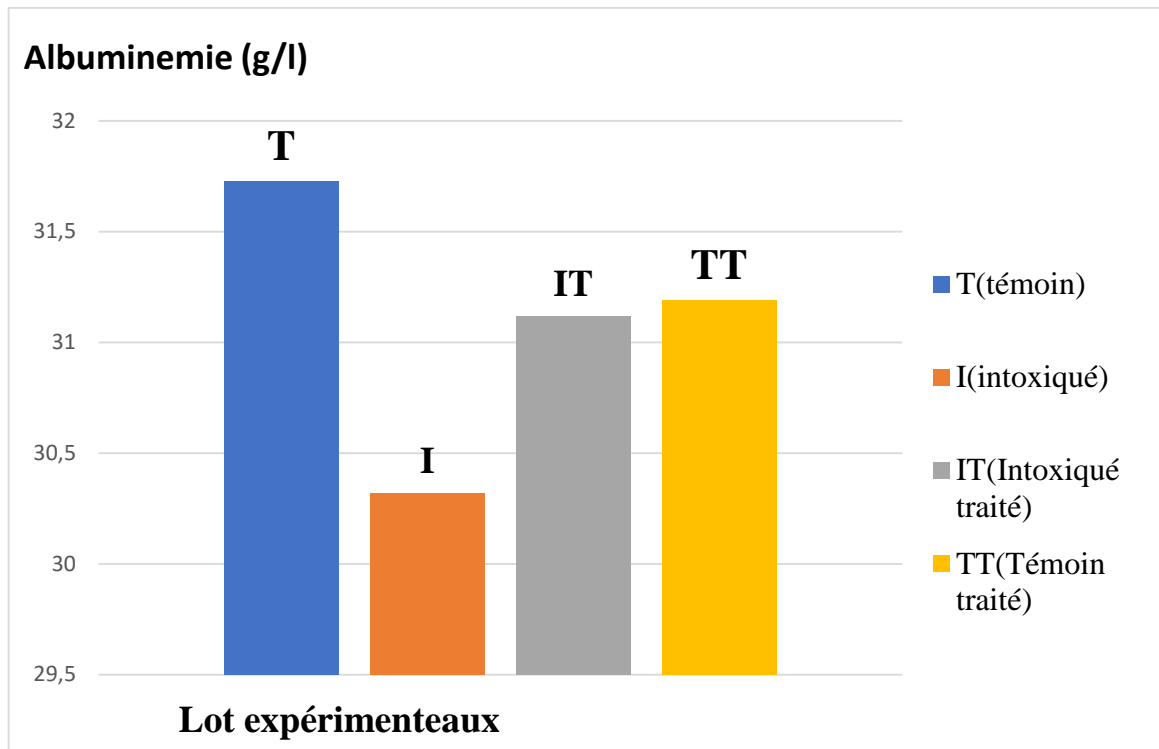
**Figure 20 :** Taux d'alanine aminotransférase (ALAT) (UI/l) chez les souris intoxiquées (I) par paracétamol (100mg/g) et (200mg/kg), intoxiquées et traitées (IT) par le curcumin (2g/kg), témoins traitées (TT) par le curcumin (2g/kg) comparées aux témoins (T) durant 14 semaines.



**Figure 21 :** Taux de gamma-glutamyl transférase (γ-GT) (U/l) chez les souris intoxiquées (I) par paracétamol (100mg/g) et (200mg/kg), intoxiquées et traitées (IT) par le curcumin (2g/kg), témoins traités (TT) par le curcumin (2g/kg) comparées aux témoins (T) durant 14 semaines.

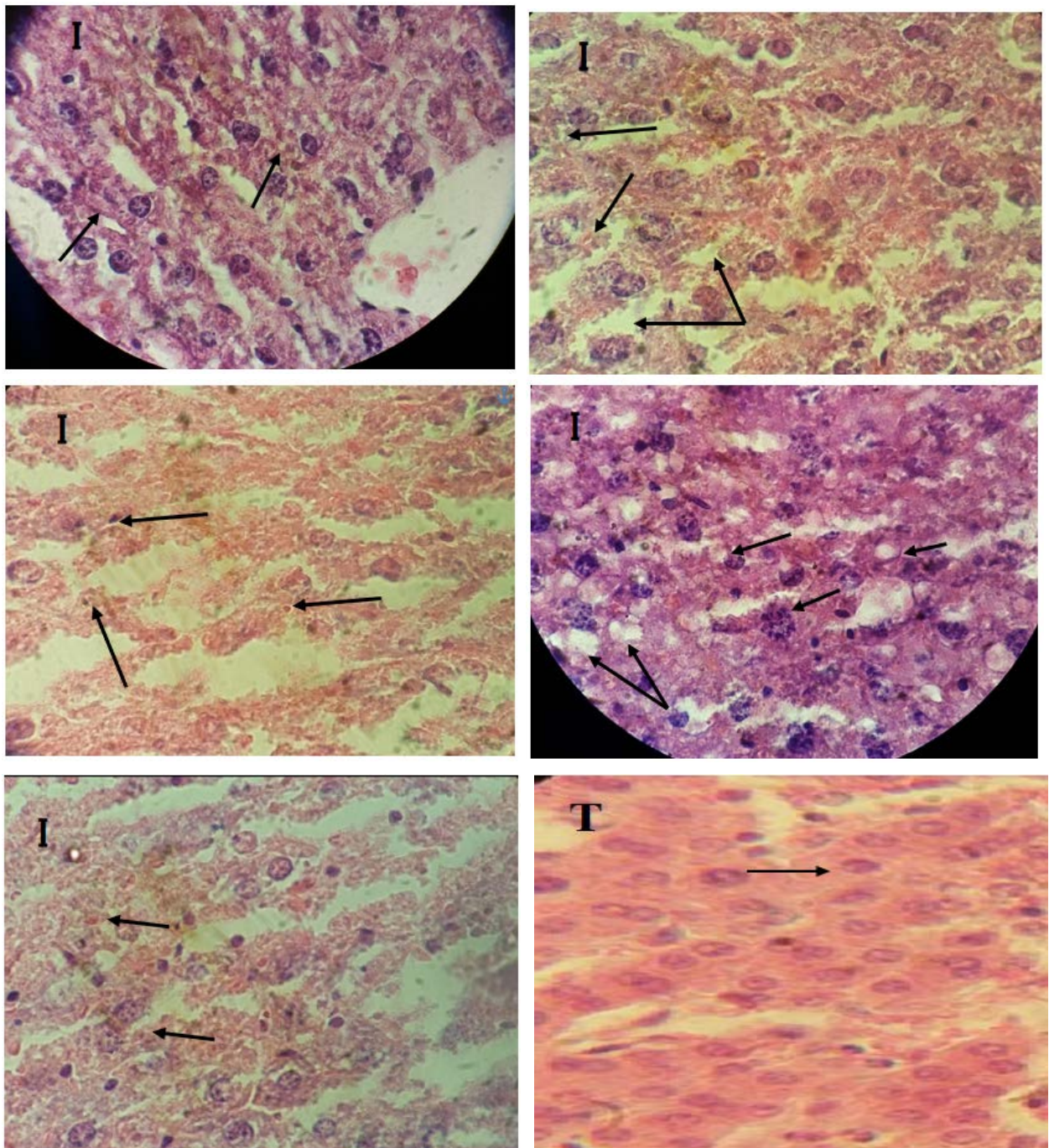


**Figure 22 :** Taux de Glycémie (U/l) chez les souris intoxiquées (**I**) par paracétamol (100mg/g) et (200mg/kg), intoxiquées et traitées (**IT**) par le curcumin (2g/kg), témoins traitées (**TT**) par le curcumin (2g/kg) comparées aux témoins (**T**) durant 14 semaines.

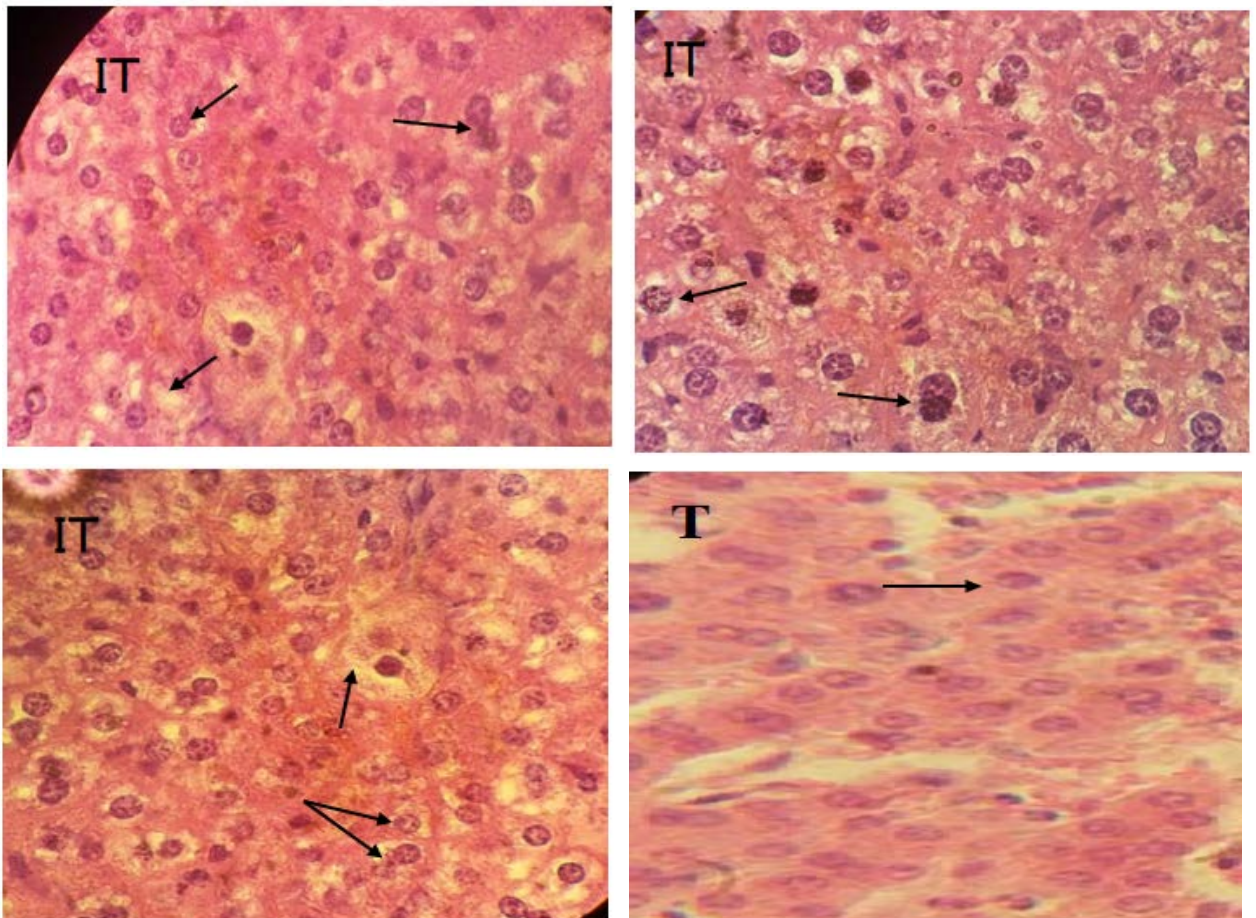


**Figure 23 :** Taux d'albuminémie chez les souris intoxiquées (**I**) par paracétamol (100mg/g) et (200mg/kg), intoxiquées et traitées (**IT**) par le curcumin (2g/kg), témoins traités (**TT**) par le curcumin (2g/kg) comparées aux témoins (**T**) durant 14 semaines

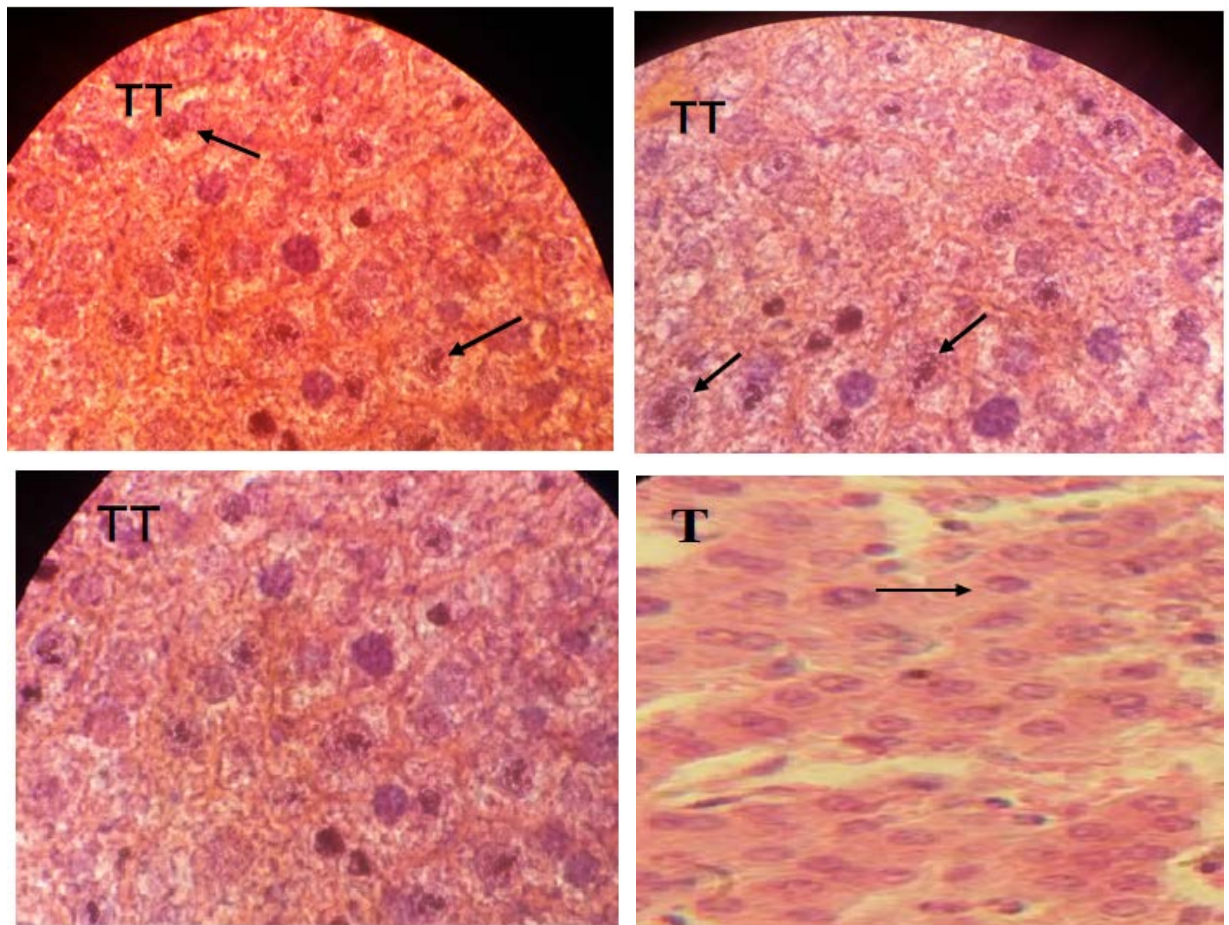
**1.1.3 Résultat de l'étude histologique des organes prélevés :**



**Figure 24 :** Etude microscopique des tissus hépatiques (Gx100) effectuée par la colorations (H.E) chez des souris intoxiquées « I » par paracétamol a une dose de (100et 200 mg/kg) durant 14 semaines comparées aux souris témoins « T ».



**Figure 25** : Etude microscopique des tissus hépatiques (Gx100) effectuée par la colorations (H.E) chez des souris intoxiquées par paracétamol a une dose de (100et 200 mg/kg) et traitées « **IT** » par le curcumin a une dose de (2g/kg) comparées aux souris témoins « **T** ».



**Figure 26** : Etude microscopique des tissus hépatiques (Gx100) effectuée par la colorations (H.E) chez des souris traitées par le curcumin a une dose de (2g/kg) « TT » comparées aux souris témoins « T ».

(I) présence des Nécrose nucléaire, Gonflement cellulaire : appelé aussi ballonnement dégénératif de cellule hépatocyte

On observe noyaux des hépatocytes augment de volume et début de nécrose nucléaire, dégénérescence hydropique, Un capillaire Sinusoïde, Des stéatoses.

L'apparence microscopique le cas des stéatoses hépatique c'est à dire une dégénérescence hépatique, le gras apparait comme de large claire discret gouttelette de graisse, il y'a une vacuole claire dans le cytoplasme de la cellule pouvant être soit situé ou autour du noyau

D'autre noyaux montrent une désolation de la chromatine nucléaire appelé caryolyse (absence du noyaux).

(TT) des hépatocyte normal et absence dégénérescence hydropique.

(IT) On observe quelle que dégénérescence hydropique et régénération hépatique, Observations des différent de phase de la mitose c'est figure pas été observé lors de la lecture microscopique du groupe de Lot 2 (I).

### **1.2 Discussion :**

Les transaminases et les  $\gamma$ -GT sont des biomarqueurs de la fonction hépatique et leur augmentation sérique est liée à l'effet hépato toxique dû au paracétamol administré par des doses toxique chez les souris, d'après les résultats obtenus on a une augmentation sérique de leur taux chez le group intoxiqué comparé aux lot souris témoin.

On peut expliquer cette élévation par l'accumulation du NAPQI non conjugué lorsque la capacité de détoxification des hépatocytes est dépassée ceci favorise la fixation du métabolite toxique par liaison covalent irréversible aux enzymes et aminoacides des protéines vitale de la cellule, et induit alors une cytolysse des cellules hépatiques.

Ces dernières déversent leur contenu dans la circulation sanguine. Le paracétamol induit alors une hépatite cytolytique correspond biologiquement à une élévation des transaminases et histologiquement a une nécrose hépatique.

Une hyperglycémie a été observé chez les souris intoxiqués et qui est probablement due à un dysfonctionnement glucidique sous l'effet du métabolite toxique (NAPQ). Ce dernier étant électrophile, possède des propriétés de radical libre, ce qui génère un stress oxydatif lorsque la vitesse de génération des radicaux libres dépasse la capacité cellulaire de leur suppression.

En effet, le stress oxydatif est responsable de multitude de dysfonctions métaboliques comme la résistance à l'insuline qui inhibe la pénétration du glucose dans les cellules, en plus en cas d'agression de métabolisme hépatique des

protéines est modifier vers la production des systèmes de défense et la néoglucogénèse.

La consommation régulière de paracétamol peut induire un déclin régulier, asymptomatique du stock de glutathion hépatique celui-ci, en dessous d'un seuil critique, perdra sa capacité à inactiver le NAPQI.

L'ingestion chronique de doses thérapeutique de paracétamol doit être envisagée dans le diagnostic différentiel d'une élévation persistante des transaminases (Watkins PB, Seff LB, 2006), une récent étude américaine portant sur élévation des transaminases à doses thérapeutiques chez 145 volontaires seins divisés en 5 groupes de traitements : un groupe placebo, trois groupes de combinaisons paracétamol opiacés (oxycodone, hydromorphone et morphine) et un groupe paracétamol seul. Dans les 4 groupes recevant le paracétamol, la dose administrée était de 4 grs/24 heures soit la dose quotidienne jugé thérapeutique, et la durée du traitement est fixée à 14 jours (le programme alimentaire est strictement contrôlé) les résultats obtenus montrent que 31 à 44% des participants présentaient une élévation des taux alanines aminotransférases (ALAT) de plus de trois fois la norme.

A l'apposer, aucun des 39 participants du groupe placébo ne présentait d'élévation ALAT de plus trois fois la norme.

Les résultats des paramètres biochimiques obtenus de notre étude concordent avec d'autre travaux de recherche sur la toxicité de paracétamol (Aouacheri et al., 2009).

La diminution du taux d'albuminémie est très importante significative chez le groupe intoxiqué comparé au témoin.

En clinique l'hypoalbuminémie peut être due à un défaut de synthèse, lui-même causé par une dénutrition, une inflammation une insuffisance hépatique.

L'albumine est une des protéines fondamentales du sang dans la mesure où elle constitue près de 60% des protéines contenues dans le plasma.

L'albumine est fabriquée par le foie et se caractérise par le fait qu'elle est soluble dans l'eau, rencontrée dans certains aliments comme le lait et les œufs. La première cause de l'hypoalbuminémie est la carence alimentaire, la maladie du pancréas comme les maladies inflammatoires peuvent aussi en être les causes.

L'efforts physiques aussi donne lieu à une déshydratation et provoque une baisse du taux d'albumine dans l'organismes et parfois lorsque l'individu est atteint d'une insuffisance rénale parce que l'albumine et les globulines sont les principales protéines trouvées dans le sang.

L'albumine constitue environ 60% des protéines totales elle fonctionne comme un transport pour des enzymes, des hormones et de médicaments. L'albumine représente également « la pression osmotique colloïdale » qui est responsable maintien du fluide dans les vaisseaux. La maladie rénale peut endommager le système de filtration des reins, provoquant une protéine à renverser dans les urines et se perdre de l'organisme, la maladie du foie reflète le taux bas d'albuminémie.

L'albumine et les globulines sont fabriqués dans le foie lorsque les cellules hépatiques sont endommagées par une maladie ou produits toxiques, elles ne peuvent pas synthétiser l'albumine, ainsi les taux de protéines totale, et les niveaux notamment d'albumine sont utilisés pour diagnostiquer et évaluer les maladies du foie. Plusieurs médicaments peuvent réduire l'ensemble des taux de protéines dans le sang parmi eux se trouvent les œstrogènes, les contraceptifs oraux et tout médicament qui est toxique pour le foie.

Le suivie du poids corporel des souris indique d'une manière générale une prise de poids importante chez les trois groupes comparés aux souris témoins et que le poids de souris augmente de manier naturelle avec leur âge.

Il semble que l'effet paracétamol n'a pas touché à l'évolution pondérale.

Des résultats semblables sont obtenus par (Aouacheri et al., 2009) chez les rates mais aucune donnée bibliographique chez les souris n'a été fournie par des recherches sur l'hépatotoxicité du paracétamol pour comparer nos résultats.

L'examen microscopique des coups histologiques au niveau du foie des souris intoxiquées a nettement montré des anomalies caractéristiques dont principalement une nécrose nucléaire, gonflement cellulaire : appelé aussi ballonnement dégénératif de cellule hépatocyte, les noyaux augmentent de volume et début de dégénérescence hydropique, un capillaire sinusoïde l'apparence des stéatoses hépatiques, c'est à dire une dégénérescence hépatique.

Ces lésions sont le résultat d'un stress oxydatif causé par le paracétamol, et qui favorise la formation de composé chimique très réactifs appelées « radicaux libre » qui ont tendance à léser toute les membranes cellulaires le gras apparait comme de large claire discret, gouttelette de graisse, présence de vacuole claire dans le cytoplasme de la cellule pouvant être soit situé ou autour du noyau, d'autres noyaux montrent une désolation de la chromatine nucléaire (caryolyse : noyaux absentes).

Par ailleurs, le curcuma a causé des accumulations périvasculaires hépatiques, qui seraient due à l'attraction des cellules inflammatoires par les polysaccharides qui sont parmi les composés essentiels du curcuma.

Néanmoins, la dose de curcumine utilisée ont réussi à régénérer le tissu hépatique par la présence des hépatocytes en multiplication (en mitose) chez les intoxiqué traité avec régénérescence lymphatique avec quelques lésions hydropiques régénérées.

Chez le groupe des souris traitées par le curcumine aspect normal des hépatocytes et absence dégénérescence (même parenchyme hépatique que celui des souris témoins)

Enfin, le curcumin est un nutriment doué d'effet antioxydant qui protège le foie et stimule la synthèse du glutathion et induit la synthèse des protéines enzymatique au niveau des hépatocytes.

# CONCLUSION

## **Conclusion :**

La toxicité hépatique du paracétamol à dose thérapeutique est maintenant reconnue. Cette toxicité peu engendre une insuffisance hépatocellulaire aigue qui s'expliqué par une élévation importante du taux des enzymes biomarqueurs de la fonction hépatique (transaminase, ALAT, ASAT et  $\gamma$ -GT), une diminution de taux glucose et d'albumine dans le sang.

Ces perturbations sont confirmées par une étude histologie qui a révélés microscopiquement des lésions provoquées dans le foie, ces derniers sont régénérées suit à l'administration (per os) d'un traitement phytothérapique en association avec le paracétamol, il semble que le curcumin a exercé un effet protecteur et anti inflammatoire puissant contre le stress oxydatif causé par le paracétamol suite a une intoxication chronique de 14 semaines.

En clinique, les patients à risque sont les consommateurs excessifs d'alcool, les patients en situation de jeune prolongé ou dénutris, les consommateurs réguliers de paracétamol ou paracétamol combiné ou d'inducteurs du CYP 450 et les patients atteints de maladies chronique du foie. La dose recommandée ne due excéder 2grs /jour avec un intervalle de plus de 4h/entre chaque prise. Toute élévation significative des transaminases et  $\gamma$ -GT et diminution du taux d'albumine chez un consommateur de paracétamol pose la question de sa toxicité.

Et enfin, d'après nos résultats le curcumin semble exercer un effet protecteur du foie contre l'intoxication par le paracétamol et dans l'état de connaissances actuelles, il est illusoire de recommander une augmentation des niveaux d'apports en polyphénols à travers notamment la consommation de suppléments nutritionnels.

Seules les recherches à venir permettent de mieux préciser les niveaux d'apport les plus favorables au maintien de la santé.

## ***Recommandations***

Un médicament est un produit chimique à l'effet thérapeutique voir l'effet toxique lorsque les doses prescrites ne sont pas respectées.

L'automédications doit bénéficier d'une grande sensibilisation en direction des citoyens pour éviter tout genre d'intoxications médicamenteuses.

Le retour ver la phytothérapie constitue un moyen de lutte contre les différents stress oxydatif de nos jours.

# **Références Bibliographiques**

## Références bibliographiques :

### (A)

- **Amas P J ; Schiff E R 2007** : Acetaminophen safety/hepatotoxicity-where do we go from here ? In : Laëtitia J 2014 : Toxicité du paracétamol : résultats d'une étude multicentrique relative aux intoxications volontaires au paracétamol dans les SAU adultes français ; p (33-37). Université Angers.
- **Albano E., Poli G., Chiarpotto E. et Al.** Paracetamol-stimulated lipid peroxidation in isolated rat and mouse hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 1983 Dec;47(3):249-63.
- **Altomare E., Vendemiale G., Albano O.** Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and non alcoholic liver diseases. *Life Sci.* 1988;43(12):991-8.
- **A. Amalraj et al.** / *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7 (2017) 205e233

### (B)

- **Bertolini A ; Ferrari A ; Ottani A ; Guerzoni S ; Tacchi R ; Leone S 2006** : Paracetamol : New Vistas of an Old Drug ; p (250-275) ; *CNS Drug Reviews* ; vol.12, No.3-4 ; Journal Compilation, Blackwell Publishing Inc.
- **Bilier R 2011** : Toxicité hépatique du paracétamol à dose thérapeutique : Revue de littérature et proposition d'un protocole d'évaluation en période postopératoire ; Thèse de doctorat ; p 17. Université de Limoges.
- **Beaulieu P 2013** : La douleur, guide pharmacologique et thérapeutique ; p 51, 49, 50 ; Maloine. Canada.
- **Bernard M, Couderc R, Cynober L.** Les aliments traditionnels: Remèdes de bonne femme Ou pharmacopée du xxie siècle l'exemple de la curcumine. 2005; *Cah.Nutr. Diét.* 40 (6): 325-333.
- **Boobis A.R., Tee L.B., Hampden C.E. et Al.** Freshly Isolated hepatocytes as a model for studying the toxicity of paracetamol. *Food Chem. Toxicol.* 1986 Jun-Jul;24(6-7):731-6.
- **Boullard B., 2001.** Dictionnaire des plantes médicinales du monde. Paris, Estem. 174.
- **Bartels S., Sivilotti M., Crosby D. et Al.** Are recommended doses of acetaminophen hepatotoxic for recently abstinent alcoholics? A randomized trial. *Clin. Toxicol. (Phila).* 2008 Mar;46(3):243-9.
- **Barbaro G., Di Lorenzo G., Soldini M. et Al.** Hepatic glutathione deficiency in chronic hepatitis C: quantitative evaluation in patients who are HIV positive and HIV negative and correlations with plasmatic and lymphocytic concentrations and with the activity of the liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 1996 Dec;91(12):2569-73.

### (C)

- **Clement-Guercia S M M 2003** : les intoxications des animaux de compagnie par les médicaments à usage humain ; Thèse de doctorat ; p 99. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.
- **Craig R C ; Stitzel R 1994** : Modern pharmacology. In : Laëtitia J 2014 : Toxicité du paracétamol : résultats d'une étude multicentrique relative aux intoxications volontaires au paracétamol dans les SAU adultes français ; p (33-37). Université Angers.
- **Cover C., Liu J., Farhood A. et Al.** Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006 Oct 1;216(1):98-107.
- **Critchley J.A., Nimmo G.R., Gregson C.A. et Al.** Inter-subject and ethnic differences in paracetamol metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1986 Dec;22(6):649-57.

### (D)

- **Davern T.J. 2nd, James L.P., Hinson J.A. et Al.** Measurement of serum acetaminophen-protein adducts in patients with acute liver failure. *Gastroenterology.* 2006 Mar;130(3):687-94.
- **Dargère S., Collet T., Crampon D.** Lack of toxicity of acetaminophen in patients with chronic hepatitis C: A randomized controlled trial. *Gastroenterology.* 2000;118: A947.
  - Davila, J. C., Lenherr, A. et Acosta, D. (1989). Protective effect of flavonoids on drug-induced hepatotoxicity in vitro. *Toxicology*, 57: 267-286
  - **DeLeve L.D., Kaplowitz N.** Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 1991 Dec;52(3):287-305. Hall A.G. Glutathione and the regulation of cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999 ;457:199-203.
  - **DeLeve L.D., Wang X., Kaplowitz N. et Al.** Sinusoidal endothelial cells as a target for acetaminophen toxicity. Direct action versus requirement for hepatocyte activation in different mouse strains. *Biochem. Pharmacol.* 1997 May 9;53(9):1339-45.
  - **Delaveau P., 1987.** Les épices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. Paris. Albin Michel. 130-136.
  - **Donahower B., McCullough S., Kurten R. et Al.** Vascular endothelial growth factor and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006 Jul;291(1):G102-9.
  - **Driad Y 2009** : Stabilité du paracétamol : application à un sachet produit en industrie pharmaceutique. In : Collin C 2012 : Le surdosage en paracétamol consécutif à une algie dentaire. Enquête épidémiologique et revue de littérature ; p 47, 49, 58. Université de Lorraine.

## (E)

- **El bahri** 2015 : Intoxication aigue au paracétamol chez l'enfant ; Thèse de doctorat ; p 18. Université Mohammed v-rabat
- **El abbouni A** 2012 : Prise en charge des intoxications au paracétamol : Etude rétrospective sur cinq ans dans le Service des Urgences adultes du CHU de Nancy ; Thèse de doctorat ; p 21. Université de lorraine.

## (G)

- **Gardner C.R., Heck D.E., Yang C.S. et Al.** Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Hepatology*. 1998 Mar;27(3):748-54.
- **Gonzalez F.J.** The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. Cyp2e1. *Drug Metab. Dispos.* 2007 Jan;35(1):1-8.
- **Grieco A., Miele L., Forgione A. et Al.** Mild hepatitis at recommended doses of acetaminophen in patients with evidence of constitutionally enhanced cytochrome P450 system activity. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2008 Jun;33(3):315-20.
- **Grugeau C., 1995.** Curcuma longa L. Thèse de doctorante en pharmacie. Université limoge.
- **Ghosh, N., Ghosh, R., Mandal, V., Mandal, S.C., 2011.** Recent advances in herbal medicine for treatment of liver diseases. *Pharm. Biol.* 49, 970–988.

## (H)

- **Hasegawa T., Malle E., Farhood A. et Al.** Generation of hypochloritemodified proteins by neutrophils during ischemia-reperfusion injury in rat liver: attenuation by ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005 Oct;289(4):G760-7.
- **Henderson C.J., Wolf C.R., Kitteringham N. et Al.** Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione S transferase Pi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000 Nov 7;97(23):12741-5.
- **Hogaboam C.M., Bone-Larson C.L., Steinhäuser M.L. et Al.** Novel CXCR2-dependent liver regenerative qualities of ELR-containing CXC chemokines. *FASEB J.* 1999 Sep;13(12):1565-74.
- **Houin G 1990 :** Pharmacocinétique : support de l'enseignement de la pharmacologie générale. In : Collin C 2012 : Le surdosage en paracétamol consécutif à une algie dentaire : Enquete épidémiologique et revue de littérature ; p 55,56. Université de lorraine.
- **Hinson J.A., Pike S.L., Pumford N.R. et Al.** Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 1998 Jun;11(6):604-7.
- **Hinson J.A., Roberts D.W., James L.P.** Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2010;(196):369-405.
- **Hinson J.A., Roberts D.W., Benson R.W. et Al.** Mechanism Of paracetamol toxicity. *Lancet.* 1990 Mar 24;335(8691):732

- **Hatcher, H., Planalp, R.,** Cho, J., Torti, F.M., Torti, S.V., 2008. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cell. Mol. Life Sci.* CMLS 65, 1631–1652

### (I)

- **Ishida Y., Kondo T., Ohshima T. et Al.** A pivotal involvement of IFN $\gamma$  in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *FASEB J.* 2002 Aug;16(10):1227-36.
- **Ito Y., Bethea N.W., Abril E.R. et Al.** Early hepatic microvascular injury in response to acetaminophen toxicity. *Microcirculation.* 2003 Oct;10(5):391-400.
- **Ito Y., Suzuki Y., Ogonuki H. et Al.** Role of iron and glutathione redox cycle in acetaminophen-induced cytotoxicity to cultured rat hepatocytes. *Dig. Dis. Sci.* 1994 Jun;39(6):1257-64.
- **Itokawa H., Shi Q., Akiyama T., Morris-Natschke S., Lee K.H., 2008.** Recent advances in the investigation of curcuminoids

### (J)

- **Jayaprakasha G.K.L., Jagan M.R., 2005.** Chemistry and biological activities of *C. longa*. *Trends in Food Science & Technology.* 533-548.
- **James L.P., Farrar H.C., Darville T.L. et Al.** Elevation of serum interleukin 8 levels in acetaminophen overdose in children and adolescents. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001 Sep;70(3):280-6.
- **Jansen P.C.M., Grubben G.J.H., Cardon D., 2005.** Ressources végétales de l'Afrique tropicale 3. Colorants et tanins. Wageningen, Pays-Bas, PROTA. 238
- **Jouzeau J-Y ; Daouphars M ; Benani A ; Netter P** 2004 :Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase ; *Gastroenterol Clin Biol*, 28, C7-C17.
- **Jollow D.J., Mitchell J.R., Potter W.Z. et Al.** Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1973 Oct;187(1):195-202.
- **Ju C., Reilly T.P., Bourdi M. et Al.** Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 2002 Dec;15(12):1504-13.

### (K)

- **Kaufman D.W., Kelly J.P., Rosenberg L. et Al.** Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the United States: the Slone survey. *JAMA.* 2002 Jan 16 ;287(3) :337-44.
- **Koop D.R.** Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J.* 1992 Jan 6;6(2):724-30.

- **Kuffner E.K., Dart R.C., Bogdan G.M. et Al.** Effect of maximal daily doses of acetaminophen on the liver of alcoholic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch. Intern. Med.* 2001 Oct 8;161(18):2247-52.
- **Kuffner E.K., Green J.L., Bogdan G.M. et Al.** The effect of acetaminophen (four grams a day for three consecutive days) on hepatic tests in alcoholic patients--a multicenter randomized study. *BMC Med.* 2007 May 30;5:13.
- **Kostrubsky S.E., Sinclair J.F., Strom S.C. et Al.** Phenobarbital and phenytoin increased acetaminophen hepatotoxicity due to inhibition of UDP glucuronosyltransferases in cultured human hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 2005 Sep;87(1):146-55.
- **Kaufman D.W. , Kelly J, P., Rosenberg L. et al .** Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the united wastes: the slone surrey. *JAMA.* 2002 Jan 16; 287 (3) : 337 – 44 .

### (L)

- **Labaune J P 1984 :** Pharmacocinétique : Principes fondamentaux. In : Collin C 2012 : Le surdosage en paracétamol consécutif à une algie dentaire : Enquete épidémiologique et revue de littérature ; p 55,56. Université de lorraine."
- **Laura P 2003 :** Acetaminophen-induced hépatotoxicity.In:Collin C 2012 : Le surdosage en paracétamol consécutif à une algie dentaire : Enquete épidémiologique et revue de littérature ; p 55,56. Université de lorraine
- **Lauterburg B.H.** Analgesics and glutathione. *Am. J. Ther.* 2002 May Jun;9(3):225-33.
- **Laskin D.L., Pilaro A.M.** Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity. I. Isolation and characterization of activated macrophages from rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986 Nov;86(2):204-15.
- **Larrey D., Letteron P., Foliot A. et Al.** Effects of pregnancy on the toxicity and metabolism of acetaminophen in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986 Apr;237(1):283-91.
- **Lim S.P., Andrews F.J., O'Brien P.E.** Acetaminophen-induced microvascular injury in the rat liver: protection with misoprostol. *Hepatology.* 1995 Dec;22(6):1776-81
- **Liu Z.X., Han D., Gunawan B. et Al.** Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology.* 2006 Jun;43(6):1220-30.
- **Lluis J.M., Colell A., García-Ruiz C. et Al.** Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress. *Gastroenterology.* 2003 Mar;124(3):708-24.
- **Lechat P 2006 :** Pharmacologie, Niveau DCEM 1 ; p 195. Université Pierre et Marie Curie.

- **Lechat P** ; Lagier G ; Boiteau J 1978 : Le paracétamol. In : El Abouni A 2012 : Prise en charge des intoxications au paracétamol : Etude rétrospective sur cinq ans dans le service des Urgences adultes du CHU de Nancy ; p 20.

Université de Lorraine

- **Le Marec C 2005** : Histoire du paracétamol. Le praticien en anesthésie. Réanimation. In : Aissat S 2010 : Mesure de l'impact toxique du paracétamol thérapeutique chez 11 alcooliques adultes dosage de taux de quelques marqueurs hépatiques, évaluation du danger encouru intoxiqués par ce médicament ; p 6.

Université Mouloud Mammeri de TiziOuzo.

- **Larson AM, Polson J, Fontana RJ et al**, Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a US multicenter, prospective study. *Hepatology* 2005 ; 42 : 1364- 72.

### (M)

- **Mitchell S.J., Hilmer S.N., Murnion B.P. et Al**. Hepatotoxicity of therapeutic short-course paracetamol in hospital inpatients : impact of ageing and frailty. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2011 Jun ;36(3) :327-35.

- **Mallet C ; Barrière D A ; Ermund A 1994** : TRPV1 in Brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. In : Bidault M 2011 : Prise en charge des intoxications au paracétamol : Etudes rétrospectives sur trois ans dans le service des urgences adultes du CHU de Limoges ; p (15-18). Université de Limoges.

- **Monnot J 2014** : Prise en charge de la douleur de l'otite de l'enfant de moins de 3 ans en médecine générale ; thèse de doctorat ; p 28, 30. Université Paris Diderot-Paris 7.

- **Mukundabantu V 2006** : [1/04/2016]. Investigation sur l'usage du paracétamol et de l'aspirine au Rwanda : cas de la ville de Butare

- **Makin A J;Wendon J ; Williams R A 1995** : 7-year experience of severe acetaminophen induced hepatotoxicity. In: Bidault M 2011: Prise en charge des intoxications au paracétamol : Etude rétrospective sur trois ans dans le service des urgences adultes du CHU de Limoges ; p 24. Université de Limoges

- **Muldrew K.L., James L.P., Coop L. et Al**. Determination of acetaminophen protein adducts in mouse liver and serum and human serum after hepatotoxic doses of acetaminophen using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Drug Metab. Dispos.* 2002 Apr;30(4):446-51.

- **Michael S.L., Mayeux P.R., Bucci T.J. et Al**. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice lacking inducible nitric oxide synthase activity. *Nitric Oxide.* 2001;5(5):432-41.

- **Meskar A., Plee-Gautier E., Amet Y**. Alcohol-xenobiotic interactions. Role of cytochrome P4502E1. *Pathol. Biol.* 2001 Nov;49(9):696-702.

## (N)

- **Navarro V.J., Senior J.R.** Drug-related hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* 2006 Feb 16;354(7):731-9. Louvet A., Boitard J., Dharancy S. et Al. Problems with therapeutic acetaminophen use in excessive drinkers. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2006 May;30(5):769-74.

## (O)

- **Ostapowicz G., Fontana R.J., Schiødt F.V. et Al.** Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann. Intern. Med.* 2002 Dec 17;137(12):947-54.

## (P)

- **Penso G., 1986.** Les plantes médicinales dans l'art et l'histoire. Paris. Roger Da Costa.
- **Perry M.C., 2008.** Evaluation de la curcumine comme agent anti cancéreux dans le traitement des tumeurs cérébrales. Mémoire Chimie Montréal.
- **Prescott L.F.** Therapeutic misadventure with paracétamol : fact or fiction ? *Am. J. Ther.* 2000 Mar ;7(2) :99-114. Larrey D. Is there a risk to prescribe paracetamol at therapeutic doses in patients with acute or chronic liver disease ? *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2006 May ;30(5) :753-5.
- **Pruvot R., Poirieux O.** Lettre aux pharmaciens hospitaliers et COMEDIMS (07/07/2008). In : AFSSAPS, Risque d'hépatotoxicité inhérent au paracétamol et en particulier aux solutions pour perfusion PERFALGAN® (paracétamol).
- **Polson J., Ocama P., Larson A. et Al.** Role of acetaminophen in acute liver failure due to viral hepatitis. *Hepatology.* 2003 Oct ;38(supp 1) :544A.
- **Pulido-Moran M,** Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C and Ramirez-Tortosa MC. Curcumin and Health. *Molecules* 2016, 21(3), 264

## (Q)

- **Queneau P 2006 :** La saga du paracétamol. In : Bidault M 2011 : Prise en charge des intoxications au paracétamol : Etudes rétrospective sur trois ans dans le service des urgences adultes du CHU de limoges ; p (15-18). Université de limoges.

## (R)

- **Roujas F ; Sorkine M 1989 :** Intoxication médicamenteuses : Le paracétamol. In : Laëtitia J 2014 : Toxicité du paracétamol : Résultats d'une étude multicentrique relative aux intoxications volontaires au paracétamol dans les SAU adultes français ; p 57,58. Université Angers
- **Reilly T.P., Brady J.N., Marchick M.R. et Al.** A protective role for cyclooxygenase-2 in drug-induced liver injury in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 2001 Dec;14(12):1620-8.

- **Roberts D.W., Bucci T.J., Benson R.W. et Al.** Immunohistochemical localization and quantification of the 3-(cystein-S-yl)-acetaminophen protein adduct in acetaminophen hepatotoxicity. *Am. J. Pathol.* 1991 Feb;138(2):359-71.
- **Rumack B.H.** Acetaminophen misconceptions. *Hepatology.* 2004 Jul;40(1):10-5.

**(S)**

- **Slattery J.T., Wilson J.M., Kalthorn T.F. et Al.** Dose-dependent pharmacokinetics of acetaminophen: evidence of glutathione depletion in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1987 Apr;41(4):413-8.
- **Schenker S., Speeg K.V. Jr, Perez A. et Al.** The effects of food restriction in man on hepatic metabolism of acetaminophen. *Clin. Nutr.* 2001 Apr;20(2):145-50.
- **Siegers C.P., Bossen K.H., Younes M. et Al.** Glutathione and glutathione-S-transferases in the normal and diseased human liver. *Pharmacol. Res. Commun.* 1982 Jan;14(1):61-72.
- **Seo K.W., Park M., Kim J.G. et Al.** Effects of benzothiazole on the xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of acetaminophen. *J. Appl. Toxicol.* 2000 Nov-Dec;20(6):427-30.
- **Seeff L.B., Cuccherini B.A., Zimmerman H.J. et Al.** Acetaminophen hepatotoxicity in alcoholics. A therapeutic misadventure. *Ann. Intern. Med.* 1986 Mar;104(3):399-404.
- **Schmidt L.E., Dalhoff K., Poulsen H.E.** Acute versus chronic alcohol consumption in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology.* 2002 Apr;35(4):876-82.
- **Sies H., de Groot H.** Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol. Lett.* 1992 Dec;64-65 Spec No:547-51.
- **Sidibé K 2003** : Utilisation des antalgiques ou analgésiques dans le Service de Chirurgie Orthopédique de l'Hôpital Gabriel Touré ; Thèse de doctorat ; p 26. Université de Bomako
- **SZASZ G., Bergmeyer H.U.,ed.** *Methods of Enzymatic analysis*, (1974) Weinheim Verlag Chemie SHEN Y., 2009- Preparation and application of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for wastewater purification. *Annale de SPT.* vol. 68(3) :
- **Schmitt H 1980** : Eléments en pharmacologie. In : Clement-guercia S M M 2003 : Les intoxications des animaux de compagnie par les médicaments à usages humain ; p (99-100). Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

**(T)**

- **TIETZ N.W.** Text book of clinical chemistry, Ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, W.B. Saunders (1999) p. 686-689. 4th (5)

(w)

- **Walker R.M., Racz W.J., McElligott T.F.** Acetaminophen-induced hepatotoxic congestion in mice. *Hepatology*. 1985 Mar-Apr;5(2):233-40.
- **Wendel A., Feuerstein S., Konz K.H.** Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 1979 Jul 1;28(13):2051-5.
- **Watkins P.B., Seeff L.B.** Drug-induced liver injury: summary of a single topic clinical research conference. *Hepatology*. 2006 Mar;43(3):618-31.
- **Whitcomb D.C., Block G.D.** Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. *JAMA*. 1994 Dec 21;272(23):1845-50.
- **Watkins P.B., Kaplowitz N., Slattery J.T. et Al.** Aminotransferase elevations in healthy adults receiving 4 grams of acetaminophen daily: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006 Jul 5;296(1):87-93.
- W.Aonachen, S. Saka, R. Djafer, G. Lefranc et al .2009 .effet protecteur du diclofenae contre le stress oxydatif induit par la toxicité du paracétamol chez le rat. *smale biologi clinique* volume 67, numéro 6, novembre – Dec 2009.
- **Watkin PB, Seef LB.** Drug-induced liver injury. Summary of a single topic clinical research conference. *hepatology* 2006; 43: 618-31

(Z)

- **Zimmerman H.J., Maddrey W.C.** Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure. *Hepatology*. 1995 Sep;22(3):767-73.

## Résumé :

Le paracétamol est suspecté d'être hépatotoxique à dose thérapeutique.

L'objectif de cette présente étude est de suivre cette toxicité à long terme

Un effectif de 37 souris de souche swiss et de différent sexe a été pris pour l'ensemble des expérimentations.

Dans un premier temps l'étude s'intéresse à la provocation de la toxicité par le paracétamol à une dose de 100 mg/kg augmentée à 200 mg/kg pendant 14 semaines et au traitement protecteur par le curcumine (2 gr/ kg) contre le stress oxydatif causé par le paracétamol.

Les résultats des paramètres biochimiques ont révélés une augmentation importante du taux des transaminases ALAT (93,28 UI), ASAT (189,07 UI) et  $\delta$ GT (224 ,20UI) et une diminution du taux de glycémie (0,30 g/l) et d'albuminémie (30,32 g/l) chez les intoxiqués traités s'approchent de ceux du groupe témoin traité.

Les coupes réalisées aux niveaux du foie ont révélés macroscopiquement des lésions importantes (nécrose hépatique) ballonnement et lésions hydropiques, vacuolisation et stéatose chez les intoxiqués. Par contre ces lésions sont moins importantes chez les intoxiqués traités .il semble que le curcumin est un puissant traitement a effet antioxydant et antiinflammatoire qui ralentisse la cascade réactionnelle de dégénérescence.

**Mots clés :** paracétamol, curcumine, souris, hépato toxicité, effet protecteur, effet anti-inflammatoire.

## Abstract:

Paracetamol is suspected of being hepatotoxic at therapeutic dose.

The goal of this study is to track this long-term toxicity

A total of 37 mice of swiss strain and of different sex was taken for all the experiments.

Initially, the study focuses on the challenge of paracetamol toxicity at a dose of 100 mg / kg increased to 200 mg / kg for 14 weeks and curcumin protective treatment (2 g / kg) against oxidative stress caused by paracetamol.

The results of the biochemical parameters revealed a significant increase in the transaminase levels ALAT (93.28 IU), ASAT (189.07 IU) and  $\delta$ GT (224, 20 IU) and a decrease in the blood glucose level (0.30 g / l) and serum albumin (30.32 g / l) in treated patients approached those in the treated control group.

Liver sections revealed macroscopically significant lesions (hepatic necrosis) bloating and hydropic lesions, vacuolization and steatosis in intoxicated patients. On the other hand, these lesions are less important in the treated addicts. It seems that curcumin is a powerful antioxidant and anti-inflammatory treatment which slows down the reaction cascade of degeneration.

**Key words:** paracetamol, curcumin, mouse, hepatotoxicity, protective effect, anti-inflammatory effect.

## خلاصة :

الباراسيتامول موضع شك في تسببه بإتلاف الكبد عند جرعة علاجية

الغرض من هذه الدراسة هو تتبع هذه الجرعة السمية على المدى الطويل

تم أخذ مجموعه 37 فار من السلالة السويسرية ومن مختلف الجنسين لجميع التجارب

في البداية، تتناول الدراسة مشكلة سمية الباراسيتامول بجرعة 100 ملغم / كغ إلى 200 ملغم / كغ لمدة 14 أسبوعاً وعلاج الكركمين

الواقى (2 غم / كغ) مقابل الإجهاد التأكسدي الناتج عن الباراسيتامول

$\delta$ GT وAST (189.07 UI)، ALT (93.28 IU) ناقلة المصل كشفت نتائج القياسات البيوكيميائية زيادة كبيرة في مستويات وانخفاض في مستويات السكر في الدم (0، 30 جم / لتر). واقترب من الزلال المصل (30.32 غم / لتر) في المرضى (U، 22420) الذين تم علاجهم في مجموعة الشاهد المعالجة.

وكشفت المقاطع الكبدية عن آفات كبيرة بشكل ملحوظ (نخر كبدي) والانتفاخ وآفات الأنساركا ، وتتكس دهني في المرضى الذين يعانون من السكر. من ناحية أخرى، هذه الآفات أقل أهمية بين مدمني المخدرات المعالجة. يبدو أن الكركمين هو أحد مضادات الأكسدة القوية والعلاج المضاد للالتهابات الذي يؤدي إلى إبطاء سلسلة تفاعل الإنحطاط

**الكلمات المفتاحية:** الباراسيتامول ، الكركمين ، الفأر ، التسمم الكبدي ، التأثير الوقائي ، التأثير المضاد للالتهابات

# **Annexes**

# Glucose liquicolor

## GOD-PAP Methode

### Enzymatischer Farbttest für Glucose

#### Handelsformen

<b>[REF]</b>	10260	4 x 100 ml	Enzymreagenz
	10121	1000 ml	Enzymreagenz
	10123	9 x 3 ml	Standard

#### [IVD]

#### Methode<sup>1</sup>

Bestimmung der Glucose nach enzymatischer Oxidation in Gegenwart von Glucoseoxidase. Indikator ist Chinonimin, das aus Wasserstoffperoxid und 4-Aminoantipyrin unter Anwesenheit von Phenol und Peroxidase gebildet wird.

#### Reaktionsprinzip



#### Wirksame Bestandteile

<b>[REF]</b>	<b>10260</b>	<b>10121</b>	<b>10123</b>
<b>[RGT]</b>	4 x 100 ml	1 x 1000 ml	
<b>[STD]</b>	1 x 3 ml	1 x 3 ml	9 x 3 ml
<b>[RGT]</b>	<b>Enzymreagenz</b>		
	Phosphatpuffer (pH 7,5)		100 mmol/l
	4-Aminoantipyrin		0,25 mmol/l
	Phenol		0,75 mmol/l
	Glucoseoxidase		≥ 15 KU/l
	Peroxidase		≥ 1,5 KU/l
	Mutarotase		≥ 2,0 KU/l
	Natriumazid		0,095 %
<b>[STD]</b>	<b>Standard</b>		
	Glucose		100 mg/dl bzw. 5,55 mmol/l

#### Herstellung der Reagenzien

[RGT] und [STD] sind gebrauchsfertig.

#### Haltbarkeit

Die Reagenzien sind auch nach Öffnen bis zum angegebenen Verfalldatum bei Lagerung zwischen 2...8°C haltbar.

Kontamination muss vermieden werden.

Bei 15...25°C ist das [RGT] 2 Wochen haltbar.

#### Untersuchungsgut

Serum, Plasma.

Die Glucose ist 24 h bei 2...8°C haltbar, wenn das Serum oder Plasma innerhalb 30 Min. nach der Blutentnahme präpariert wird.

#### Bestimmungsansatz

Wellenlänge: 500 nm, Hg 546 nm

Schichtdicke: 1 cm

Temperatur: 20...25°C oder 37°C

Messung: Gegen Reagenzleerwert. Für jede Messreihe genügt ein Reagenzleerwert.

#### Pipettierschema

In Küvetten pipettieren	Makro		Halbmikro	
	[STD] oder Probe	Reagenzleerwert	[STD] oder Probe	Reagenzleerwert
[STD] oder Probe	20 µl	---	10 µl	---
[RGT]	2000 µl	2000 µl	1000 µl	1000 µl

Mischen, 10 Min. bei 20...25°C oder 5 Min. bei 37°C inkubieren. Innerhalb von 60 Min. Extinktion des Standards und der Proben gegen den Reagenzleerwert messen (ΔE).

#### Berechnung der Glucose-Konzentration

$$c = 100 \times \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{[STD]}}} \text{ [mg/dl] oder}$$

$$c = 5,55 \times \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{[STD]}}} \text{ [mmol/l]}$$

#### Leistungscharakteristik

##### Linearität

Der Test ist bis zu einer Glucose-Konzentration von 400 mg/dl oder 22,2 mmol/l linear. Bei höheren Glucosekonzentrationen die Probe 1+2 mit dest. Wasser verdünnen. Ergebnis mit 3 multiplizieren.

Typische Leistungsdaten sind im Verification Report zu finden, zugänglich über

[www.human.de/data/gb/vr/su-gllq.pdf](http://www.human.de/data/gb/vr/su-gllq.pdf) oder

[www.human-de.com/data/gb/vr/su-gllq.pdf](http://www.human-de.com/data/gb/vr/su-gllq.pdf)

Wenn die Leistungsdaten nicht über das Internet zugänglich sind, stellt sie unser lokaler Distributor kostenlos zur Verfügung.

##### Normalbereich<sup>2</sup>

Serum, Plasma (nüchtern): 75-115 mg/dl bzw. 4,2-6,4 mmol/l

##### Qualitätskontrolle

Es können alle Kontrollseren mit nach dieser Methode ermittelten Sollwerten eingesetzt werden.

Wir empfehlen unsere HUMATROL Kontrollseren, die aus tierischen Seren hergestellt werden, oder unser SERODOS auf Humanserum-Basis.

##### Automation

Vorschläge zur Applikation der Reagenzien auf Automaten stehen auf Anforderung zur Verfügung. Die Validierung der Applikation liegt in der Verantwortung des Labors.

##### Hinweise

1. Ikerische Seren stören den Test und sollten nicht verwendet werden. Triglyceride bis 2500 mg/dl, Hämoglobin bis 500 mg/dl und Ascorbinsäure bis 20 mg/dl stören den Test nicht.
2. Während der Lagerung kann sich ein leichter bräunlicher Niederschlag bilden, der die Funktion von [RGT] nicht beeinflusst. Beim Pipettieren diesen Niederschlag nicht aufwirbeln.

##### Sicherheitshinweise

[STD] Achtung!

##### Gefahrenhinweise

H315 Verursacht Hautreizungen.

H319 Verursacht schwere Augenreizung.

H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

##### Sicherheitshinweise

P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

P321 Besondere Behandlung (siehe auf diesem Kennzeichnungsetikett). P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

P501 Entsorgung des Inhalts / des Behälters gemäß den örtlichen / regionalen / nationalen / internationalen Vorschriften.

##### Literatur

1. Barham D., Trinder P., Analyst 97 (1972)
2. Teuscher A., Richterich P., Schweiz. med. Wschr. 101, 345 und 390 (1971)

SU-GLLQ2

INF 1026002 D

05-2015-25M



# Human

# GLUCOSE liquicolor

## GOD-PAP Method

### Enzymatic Colorimetric Test for Glucose

#### Package Sizes

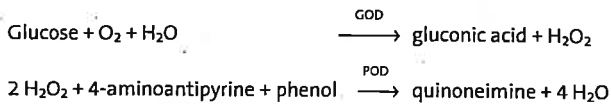
<b>[REF]</b>	10260	4 x 100 ml	Enzyme Reagent
	10121	1000 ml	Enzyme Reagent
	10123	9 x 3 ml	Standard

#### **[IVD]**

#### Method<sup>1</sup>

The glucose is determined after enzymatic oxidation in the presence of glucose oxidase. The formed hydrogen peroxide reacts under catalysis of peroxidase with phenol and 4-aminoantipyrine to a red-violet quinoneimine dye as indicator.

#### Reaction Principle



#### Contents

<b>[REF]</b>	<b>10260</b>	<b>10121</b>	<b>10123</b>
<b>[RGT]</b>	4 x 100 ml	1 x 1000 ml	
<b>[STD]</b>	1 x 3 ml	1 x 3 ml	9 x 3 ml
<b>[RGT]</b>	<b>Enzyme reagent</b> Phosphate buffer (pH 7.5) 100 mmol/l 4-Aminoantipyrine 0.25 mmol/l Phenol 0.75 mmol/l Glucose oxidase ≥ 15 KU/l Peroxidase ≥ 1.5 KU/l Mutarotase ≥ 2.0 KU/l Sodium azide 0.095 %		
<b>[STD]</b>	<b>Standard</b> Glucose 100 mg/dl or 5.55 mmol/l		

#### Reagent Preparation

**[RGT]** and **[STD]** are ready for use.

#### Reagent Stability

The reagents are stable even after opening up to the given expiry date when stored at 2...8°C. Contamination must be avoided.

At 15...25°C **[RGT]** is stable for 2 weeks.

#### Specimen

Serum, plasma.

The glucose is stable for 24 hours at 2...8°C, if serum or plasma is prepared within 30 min. after collection.

#### Assay

Wavelength: 500 nm, Hg 546 nm

Optical path: 1 cm

Temperature: 20...25°C or 37°C

Measurement: Against reagent blank. Only one reagent blank per series is required.

#### Pipetting Scheme

Pipette into cuvettes	Macro		Semi micro	
	<b>[STD]</b> or sample	Reagent blank	<b>[STD]</b> or sample	Reagent blank
<b>[STD]</b> or sample	20 µl	---	10 µl	---
<b>[RGT]</b>	2000 µl	2000 µl	1000 µl	1000 µl

Mix, incubate for 10 min. at 20...25°C or 5 min. at 37°C. Measure the absorbance of **[STD]** and the sample against the reagent blank within 60 min. (ΔA).

#### Calculation of the Glucose Concentration

$$c = 100 \times \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{[STD]}}} \text{ [mg/dl] or}$$

$$c = 5.55 \times \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{[STD]}}} \text{ [mmol/l]}$$

#### Performance Characteristics

##### Linearity

The test is linear up to a glucose concentration of 400 mg/dl or 22.2 mmol/l. Dilute the sample 1+2 with dest. water, if the glucose concentration of the sample is over this limit and repeat the determination. Multiply the result by 3.

Typical performance data can be found in the Verification Report, accessible via:

[www.human.de/data/gb/vr/su-gllq.pdf](http://www.human.de/data/gb/vr/su-gllq.pdf) or

[www.human-de.com/data/gb/vr/su-gllq.pdf](http://www.human-de.com/data/gb/vr/su-gllq.pdf)

If the performance data are not accessible via internet, they can be obtained free of charge from your local distributor.

##### Reference Values<sup>2</sup>

Serum, plasma (fasting): 75 - 115 mg/dl or 4.2-6.4 mmol/l

##### Quality Control

All control sera with glucose values determined by this method can be used.

We recommend to use our quality control sera HUMATROL based on animal serum or our SERODOS based on human serum.

##### Automation

Proposals to apply the reagents on analysers are available on request. Each laboratory has to validate the application in its own responsibility.

##### Notes

- Icteric sera interfere with the test and should not be used as a sample. Triglycerides up to 2500 mg/dl, hemoglobin up to 500 mg/dl and ascorbic acid up to 20 mg/dl do not interfere with the test.
- A slight brownish sediment may develop as **[RGT]** ages that does not influence the functionality of **[RGT]**. Do not swirl up this sediment during pipetting.

##### Safety Notes

###### **[STD]** Warning!

###### Hazard statements

H315 Causes skin irritation.

H319 Causes serious eye irritation.

H412 Harmful to aquatic life with long lasting effects.

###### Precautionary statements

P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P321 Specific treatment (see on this label).

P362 Take off contaminated clothing and wash before reuse.

P501 Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

##### References

- Barham D., Trinder P., Analyst **97** (1972)
- Teuscher A., Richterich P., Schweiz. med. Wschr. **101**, 345 and 390 (1971)

SU-GLLQ2

INF 1026002 GB

05-2015-25M



# Human



Liquid Reagents – ready to use

## GOT (AST)

(Glutamate Oxaloacetate Transaminase)

Modified IFCC

2 Reagents

Diagnostic reagent for quantitative in vitro determination of GOT (AST) in human serum or plasma on photometric systems.

REF

Cont.

254L 4 x 62.5 ml 4 x 50 ml Reagent 1  
4 x 12.5 ml Reagent 2

Additionally offered:

481 6 x 5 ml Control serum normal  
482 6 x 5 ml Control serum pathologic  
483 3 x 3 ml Multi calibration serum

### TEST PARAMETERS

Method: UV, Kinetic, Decreasing Reaction, modified IFCC  
Wavelength: Hg 334 nm, Hg 365 nm, 340 nm  
Temperature: 25°C, 30°C, 37°C  
Sample: Serum, EDTA-plasma, heparinized plasma  
Linearity: up to 940 U/L on Hitachi 911  
Sensitivity: The lower limit of detection is 2 U/L

### REAGENT COMPOSITION

#### COMPONENTS

#### FINAL CONCENTRATION

Reagent 1:  
Tris, pH 7.8 80 mmol/L  
L-Aspartate 240 mmol/L  
MDH  $\geq 600$  U/L  
LDH  $\geq 1200$  U/L  
Reagent 2:  
2-Oxoputarate 12 mmol/L  
NADH 0.18 mmol/L

### REAGENT PREPARATION

Substrate Start:  
Reagents are ready for use.

Sample Start:  
Mix 4 parts of Reagent 1 with 1 part of Reagent 2.  
(= Working Reagent)

### REAGENT STABILITY AND STORAGE

Conditions:

protect from light  
close immediately after use  
do not freeze the reagents!

Substrate Start:

at 2 – 8°C

Storage:

up to the expiration date

Stability:

at 2 – 8°C 4 weeks

Sample Start (Working Reagent):

at 15 – 25°C 5 days

Minimum allowable absorbance of the Working Reagent measured at 340 nm against water as reference is 1.6.

### SAMPLE STABILITY AND STORAGE

Loss of activity: at 2 – 8°C < 8 % within 3 days  
at 15 – 25 °C < 10 % within 3 days

Stability: at -20 °C at least 3 months  
Discard contaminated specimens.

### INTERFERING SUBSTANCES

no interference up to:  
ascorbic acid 30 mg/dl  
bilirubin 40 mg/dl  
triglycerides 2000 mg/dl  
The presence of hemoglobin in serum indicates destruction of erythrocytes with release of GOT, thus producing high interference.

### MANUAL TEST PROCEDURE

Bring reagents and samples to room temperature.

Note: If pyridoxal phosphate (PP) is used, please consult instruction insert for PP before performing test (for Substrate Start only).

#### Substrate Start

Pipette into test tubes	25°C, 30°C	37°C
Reagent 1	1000 µl	1000 µl
Sample	200 µl	100 µl
Mix. Incubate for approximately 5 min. Then add:		
Reagent 2	250 µl	250 µl
Mix. Read initial absorbance against air after 1 min. and start a timer.		
Read absorbance again after exactly 1, 2 and 3 min.		

#### Sample Start (Do not use Sample Start with pyridoxal phosph.)

Pipette into test tubes	25°C, 30°C	37°C
Working reagent for sample start	1000 µl	1000 µl
Sample	200 µl	100 µl
Mix. Read initial absorbance against air after 1 min. and start a timer.		
Read absorbance again after exactly 1, 2 and 3 min.		

### CALCULATION (light path 1 cm)

GOT (U/L) =  $\Delta A/min \times Factor$

Factors:

Substrate Start:	25° or 30°C	37°C
Factor at 340 nm	1151	2143
Factor at 334 nm	1173	2184
Factor at 365 nm	2132	3971
Sample Start:	25° or 30°C	37°C
Factor at 340 nm	952	1745
Factor at 334 nm	971	1780
Factor at 365 nm	1765	3235

## UNIT CONVERSION

U/L x 0.01667 =  $\mu$ katal/L

## REFERENCE RANGE \*(U/L)

without addition of pyridoxal phosphate:

	25°C	30°C	37°C
Males:	< 18	< 25	< 37
Females:	< 15	< 21	< 31

with addition of pyridoxal phosphate:

	30°C	37°C
Males:	7 - 34	10 - 50
Females:	7 - 24	10 - 35

\* It is recommended that each laboratory establishes its own normal range.

## TEST PRINCIPLE

NADH is oxidized to NAD<sup>+</sup>, the resulting decrease in absorbance at 340 nm is directly proportional to the activity of GOT in the sample.

L-Aspartate-2-Oxoglutarate <math>\xrightarrow{\text{GOT}}</math> Oxaloacetate + L-Glutamate  
Oxaloacetate + NADH + H<sup>+</sup> <math>\xrightarrow{\text{MDH}}</math> L-Malate + NAD<sup>+</sup>

This is a modified formulation for the assay of GOT, as recommended by the IFCC (International Federation of Clinical Chemistry). The IFCC reference method includes pyridoxal phosphate (PP). PP functions as coenzyme in AA transfer, therefore addition of PP results in increased enzyme activity. It avoids falsely low values in samples containing insufficient endogenous PP, e.g. from patients with myocardial infarction, liver disease and intensive care patients.

## ABBREVIATIONS

AA = Amino Acid  
GOT = Glutamate Oxaloacetate Transaminase  
MDH = Malate Dehydrogenase  
NAD<sup>+</sup> = Nicotinamide Adenine Dinucleotide  
NADH = reduced NAD  
LDH = Lactate Dehydrogenase

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### LINEARITY

The assay is linear up to a  $\Delta A/\text{min} = 0.16$  at 340nm and 334nm or 0.08 at 365nm.  
Above this concentration dilute the sample with NaCl solution (9 g/L sodium chloride in dist. water) and reassay multiplying the result by the dilution factor.

### PRECISION (at 37°C)

Without P-5-P

Intra-assay n = 20	Mean [U/L]	SD [U/L]	CV [%]
Sample 1	25.1	0.82	3.25
Sample 2	51.3	1.57	3.06
Sample 3	116	0.90	0.77

Inter-assay

n = 20	Mean [U/L]	SD [U/L]	CV [%]
Sample 1	25.7	1.13	4.40
Sample 2	48.6	0.67	1.38
Sample 3	115	0.80	0.69

With P-5-P

Intra-assay n = 20	Mean [U/L]	SD [U/L]	CV [%]
Sample 1	43.6	1.10	2.51
Sample 2	74.5	1.79	2.41
Sample 3	174	3.18	1.83

Inter-assay

n = 20	Mean [U/L]	SD [U/L]	CV [%]
Sample 1	44.0	1.59	3.61
Sample 2	77.0	3.05	3.97
Sample 3	187	3.37	1.80

## METHOD COMPARISON

Without P-5-P

A comparison between Biotechnica GOT (AST) without P-5-P (y) and a commercially available test (x) using 78 samples gave following results:  $y = 0.98 x - 0.51$  U/l;  $r = 0.999$ .

With P-5-P

A comparison between Biotechnica GOT (AST) (y) with P-5-P and a commercially available test (x) using 80 samples gave following results:  $y = 0.97 x - 0.79$ ;  $r = 0.995$ .

## QUALITY CONTROL

All control sera with GOT values determined by this method can be used.

We recommend:

REF	Cont.
481	6 x 5 ml
482	6 x 5 ml

Control serum normal  
Control serum pathologic

## CALIBRATION

The use of a GOT Calibrator is optional.

We recommend:

REF	Cont.
483	3 x 3 ml

Multi calibration serum

## AUTOMATION

Special adaptations for automated analyzers can be made on request.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The reagents contain sodium azide (0.95 g/L) as preservative. Do not swallow! Avoid contact with skin and mucous membranes.
2. Take the necessary precautions for the use of laboratory reagents.

## WASTE MANAGEMENT

Please refer to local legal requirements.

## REFERENCES

1. Clin. Chem. Acta 105 (1980) S. 147 - 172.
2. Synopsis der Leberkrankheiten: H. Wallhöfer, E. Schmidt u. F. W. Schmidt, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1974.
3. Thefeld W. et al, Dt. Med. Wschr. 99 (1974), 343.

## ABBREVIATIONS

AA = Amino Acid  
GOT = Glutamate Oxaloacetate Transaminase  
MDH = Malate Dehydrogenase  
NAD<sup>+</sup> = Nicotinamide Adenine Dinucleotide  
NADH = reduced NAD  
LDH = Lactate Dehydrogenase

We recommend:

REF	Cont.
481	6 x 5 ml
482	6 x 5 ml

Control serum normal  
Control serum pathologic

## CALIBRATION

The use of a GOT Calibrator is optional.

We recommend:

REF	Cont.
483	3 x 3 ml

Multi calibration serum

## AUTOMATION

Special adaptations for automated analyzers can be made on request.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

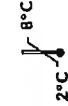
1. The reagents contain sodium azide (0.95 g/L) as preservative. Do not swallow! Avoid contact with skin and mucous membranes.
2. Take the necessary precautions for the use of laboratory reagents.

## WASTE MANAGEMENT

Please refer to local legal requirements.

## REFERENCES

1. Clin. Chem. Acta 105 (1980) S. 147 - 172.
2. Synopsis der Leberkrankheiten: H. Wallhöfer, E. Schmidt u. F. W. Schmidt, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1974.
3. Thefeld W. et al, Dt. Med. Wschr. 99 (1974), 343.



Biotechnica Instruments S.p.A., Via Licenza 18,  
00156 Rome (Italy)  
Tel. (+39) 06 411 2316 Fax: (+39) 06 410 3079  
E-mail: [bl@biotechnica.it](mailto:bl@biotechnica.it) Website: [www.biotechnica.it](http://www.biotechnica.it)



Liquid Reagents – ready to use

## GPT (ALT)

(Glutamate - Pyruvate Transaminase)  
Modified IFCC  
2 Reagents

Diagnostic reagent for quantitative in vitro determination of GPT (ALT) in human serum or plasma on photometric systems

REF Cont.

264L 4 x 62.5 ml 4 x 50 ml 4 x 12.5 ml Reagent 1 Reagent 2

Additionally offered:  
481 6 x 5 ml Control serum normal  
482 6 x 5 ml Control serum pathologic  
483 3 x 3 ml Multi calibration serum

### TEST PARAMETERS

Method: UV, Kinetic, Decreasing Reaction, modified IFCC  
Wavelength: 340 nm, Hg 334 nm, Hg 365 nm  
Temperature: 25°C, 30°C, 37°C  
Sample: Serum, EDTA-plasma, heparin, plasma  
Linearity: up to 600 U/L on Hitachi 911  
Sensitivity: The lower limit of detection is 4 U/L

### REAGENT COMPOSITION

COMPONENTS	FINAL CONCENTRATION
Reagent 1:	
Tris, pH 7.5	100 mmol/L
L-Alanine	500 mmol/L
LDH	≥ 1800 U/L
Reagent 2:	
2-Oxoglutarate	15 mmol/L
NADH	0.18 mmol/L

### REAGENT PREPARATION

**Substrate Start:**  
Reagents are ready for use.

**Sample Start:**  
Mix 4 parts of Reagent 1 with 1 part of Reagent 2. (= Working Reagent)

### REAGENT STABILITY AND STORAGE

**Conditions:**  
protect from light  
close immediately after use  
do not freeze the reagents!

**Substrate Start:**  
at 2 – 8 °C  
**Storage:**  
up to the expiration date

**Sample Start (Working Reagent):**  
Stability:  
at 2 – 8 °C 4 weeks  
at 15 – 25 °C 5 days  
Minimum allowable absorbance of the Working Reagent measured at 340 nm against water as reference is 1,6.

### SAMPLE STABILITY AND STORAGE

**Loss of activity:**  
at 2 - 8 °C < 10 % within 3 days  
at 15 - 25 °C < 17 % within 3 days  
**Stability:**  
at -20 °C at least 3 months  
Discard contaminated specimens.

### INTERFERING SUBSTANCES

no interference up to:  
ascorbic acid 30 mg/dl  
bilirubin 40 mg/dl  
hemoglobin 400 mg/dl  
triglycerides 2000 mg/dl

### MANUAL TEST PROCEDURE

Bring reagents and samples to room temperature.  
Note: If pyridoxal phosphate (PP) is used, please consult instruction insert for PP before performing test (for Substrate Start only).

#### Substrate start

Pipette into test tubes	25°C, 30°C	37°C
Reagent 1	1000 µl	1000 µl
Sample	200 µl	100 µl
Mix: Incubate for approximately 5 min. Then add:		
Reagent 2	250 µl	250 µl
Mix: Read initial absorbance against air after 1 minute and start a timer.		
Read absorb. again after exactly 1, 2 and 3 min.		

#### Sample start

Pipette into test tubes	25°C, 30°C	37°C
Working reagent for sample start	1000 µl	1000 µl
Sample	200 µl	100 µl
Mix: Read initial absorbance against air after 1 minute and start a timer.		
Read absorb. again after exactly 1, 2 and 3 min.		

### CALCULATION (light path 1 cm)

GPT (U/L) = ΔA/min x Factor

**Factors:**

Substrate start:	25° or 30°C	37°C
Factor at 340 nm	1151	2143
Factor at 334 nm	1173	2184
Factor at 365 nm	2132	3971
<b>Sample start:</b>	25° or 30°C	37°C
Factor at 340 nm	952	1745
Factor at 334 nm	971	1780
Factor at 365 nm	1765	3235

## UNIT CONVERSION

U/L x 0.01667 =  $\mu$ katal/L

## REFERENCE RANGE \*(U/L)

without addition of pyridoxal phosphate:

	25°C	30°C	37°C
Males	< 22	< 29	< 41
Females	< 17	< 22	< 31

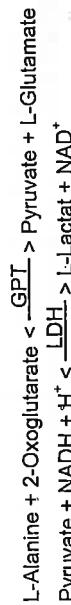
with addition of pyridoxal phosphate:

	30°C	37°C
Males*	7 – 36	10 – 50
Females	7 – 25	10 – 35

\*It is recommended that each laboratory establishes its own expected range.

## TEST PRINCIPLE

NADH is oxidized to NAD<sup>+</sup>, the resulting decrease in absorbance at 340 nm is directly proportional to the activity of GPT in the sample



This is a modified formulation for the assay of GPT, as recommended by the IFCC (International Federation of Clinical Chemistry). The IFCC reference method includes pyridoxal phosphate (PP). PP functions as coenzyme in AA transfer, therefore addition of PP results in increased enzyme activity. It avoids falsely low values in samples containing insufficient endogenous PP, e.g. from patients with myocardial infarction, liver disease and intensive care patients.

## ABBREVIATIONS

AA = Amino Acid

GPT = Glutamate-Pyruvate Transaminase

NAD<sup>+</sup> = Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NADH = Reduced NAD

LDH = Lactate Dehydrogenase

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### LINEARITY

The assay is linear up to a  $\Delta A/\text{min} = 0.16$  at 340nm and 334nm or 0.08 at 365nm.

Above this concentration, dilute the sample NaCl solution (9 g/L sodium chloride in water) and reassay multiplying the result by the dilution factor.

### PRECISION (at 37°C)

Without P-5-P

Intra-assay n = 20	Mean [U/L]	SD [U/L]	CV [%]
Sample 1	22.2	1.38	6.22
Sample 2	44.8	1.17	2.62
Sample 3	101	1.02	1.00

With P-5-P

Intra-assay n = 20	Mean [U/L]	SD [U/L]	CV [%]
Sample 1	22.8	0.70	3.08
Sample 2	42.6	0.68	1.60
Sample 3	99.3	0.92	0.92

With P-5-P

Intra-assay n = 20	Mean [U/L]	SD [U/L]	CV [%]
Sample 1	33.8	1.25	3.71
Sample 2	72.0	2.04	2.83
Sample 3	128	2.77	2.16

With P-5-P

Intra-assay n = 20	Mean [U/L]	SD [U/L]	CV [%]
Sample 1	33.3	0.99	2.96
Sample 2	72.1	1.36	1.88
Sample 3*	133	1.76	1.32

## METHOD COMPARISON

Without P-5-P

A comparison between Biotechnica GPT (ALT) without P-5-P (y) and a commercially available test (x) using 78 samples gave following results:  $y = 1.00 x + 0.00$  U/l;  $r = 0.999$ .

With P-5-P

A comparison between Biotechnica GPT (ALT) with P-5-P (y) and a commercially available test (x) using 80 samples gave following results:  $y = 1.00 x + 0.00$  U/l;  $r = 0.994$ .

## QUALITY CONTROL

All control sera with GPT values determined by this method can be used.

We recommend:

**REF** **Cont.**

**481** 6 x 5 ml Control serum normal

**482** 6 x 5 ml Control serum pathologic

## CALIBRATION

The use of a GPT Calibrator is optional.

We recommend:

**REF** **Cont.**

**483** 3 x 3 ml Multi calibration serum

## AUTOMATION

Special adaptations for automatic analyzers can be made on request.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

Take the necessary precautions for the use of laboratory reagents.

## WASTE MANAGEMENT

Please refer to local legal requirements.

## REFERENCES

1. Clin. Chem. Acta 105 (1980) S. 147 - 172.
2. Synopsis der Leberkrankheiten: H. Wallhöfer, E. Schmidt u. F. W. Schmidt, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1974.
3. Thefeld W. et al, Dt. Med. Wschr. 99 (1974), 343.

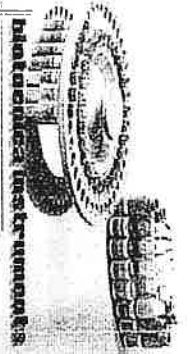
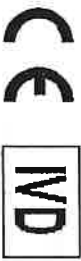


2°C 8°C

**IVD**



Biotechnica Instruments S.p.A., Via Licenza 18,  
00156 Rome (Italy)  
Tel. (+39) 06 411 2316 Fax: (+39) 06 410 3079  
E-mail: [bl@biotechnica.it](mailto:bl@biotechnica.it) Website: [www.biotechnica.it](http://www.biotechnica.it)



Liquid Reagents – ready to use

## GAMMA GT

( $\gamma$ -Glutamyl Transferase)  
 SZASZ, standardized to IFCC  
 2 Reagents

Diagnostic reagent for quantitative in vitro determination of gamma-glutamyltransferase (gamma-GT) in human serum or plasma on photometric systems

REF Cont.

234L 4 x 62.5 ml 4 x 50 ml Reagent 1  
 4 x 12.5 ml Reagent 2

Additionally offered:  
 481 6 x 5 ml Control serum normal  
 482 6 x 5 ml Control serum pathologic  
 483 3 x 3 ml Multi calibration serum

### TEST PARAMETERS

Method: Colorimetric, Kinetic, Increasing Reaction  
 SZASZ, standardized to IFCC  
 Wavelength: 405 nm (400 – 420 nm)  
 Temperature: 37°C  
 Sample: Serum, heparin plasma  
 Linearity: up to 284 U/L (Szasz, Substrate start)  
 up to 232 U/L (Szasz, Sample start)  
 up to 321 U/L (IFCC, Substrate start)  
 up to 262 U/L (IFCC, Sample start)  
 Sensitivity: The lower limit of detection is 2 U/L

### REAGENT COMPOSITION

COMPONENTS	FINAL CONCENTRATION
Reagent 1:	
Glycylglycine	100 mmol/L
Tris, pH 8.25	100 mmol/L
Reagent 2:	
L-Gamma-Glutamyl-3-Carboxy-4-Nitroanilide	4 mmol/L

### REAGENT PREPARATION

**Substrate Start:**  
 Reagents are ready for use.  
**Sample Start:**  
 Mix 4 parts of Reagent 1 with 1 part of Reagent 2.  
 (= Working Reagent)

### REAGENT STABILITY AND STORAGE

Conditions: protect from light  
 close immediately after use  
 do not freeze!  
**Substrate Start:**  
 Storage: at 2 – 8°C  
 Stability: up to the expiration date  
**Sample Start (Working Reagent):**  
 Storage: at 2-8°C  
 Stability: 4 weeks  
 Maximum allowable absorbance of the Working Reagent measured at 405 nm against water as reference is 1.3.

### SAMPLE STABILITY AND STORAGE

Stability: at -20 - +25°C at least 1 week

### INTERFERING SUBSTANCES

no interference up to:  
 ascorbic acid 30 mg/dl  
 bilirubin 40 mg/dl  
 triglycerides 2000 mg/dl  
 hemoglobin 400 mg/dl

### MANUAL TEST PROCEDURE

Bring reagents and samples to room temperature.

#### Substrate start 37°C

Pipette into test tubes:	Blank	Sample
Reagent 1	1000 µl	1000 µl
Distilled water	100 µl	
Sample		100 µl
Mix. Incubate for approximately 1 minute. Then add:		
Reagent 2	250 µl	250 µl
Mix. Read initial absorbance after 1 minute and start a timer. Read absorbance again after exactly 1, 2 and 3 minutes. Determine $\Delta A/min$ , during the linear part of the assay.		

#### Sample start 37°C

Pipette into test tubes	Blank	Sample
Working reagent	1000 µl	1000 µl
Distilled water	100 µl	
Sample		100 µl
Mix. Read initial absorbance after 1 minute and start a timer. Read absorbance again after exactly 1, 2 and 3 minutes. Determine $\Delta A/min$ , during the linear part of the assay.		

### CALCULATION (light path 1 cm)

$\Delta A/min = [\Delta A/min \text{ sample}] - [\Delta A/min \text{ blank}]$   
 $\text{Gamma-GT (U/L)} = \Delta A/min \times \text{Factor}$

Factors (25/30/37°C):	Szasz	IFCC
For Substrate Start:	1421	1606
For Sample start:	1158	1309

### UNIT CONVERSION

U/L x 0.01667 =  $\mu\text{katal/L}$

## REFERENCE RANGE \*(U/L)

According to Szasz:

Women	< 32
Men	< 49

According to IFCC:

	Female	Male
Adults	< 38 U/L	< 55 U/L
1 day – 6 months	15 – 132 U/L	12 – 122 U/L
6 months – 1 year	1 – 39 U/L	1 – 39 U/L
1 – 12 years	4 – 22 U/L	3 – 22 U/L
13 – 18 years	4 – 24 U/L	2 – 42 U/L

\* It is recommended that each laboratory establishes its own normal range.

## TEST PRINCIPLE

Gamma-GT catalyzes the transfer of glutamic acid to acceptors like glycylglycine. This process releases 5-amino-2-nitrobenzoate, which can be measured at 405 nm. The increase in absorbance at this wavelength is directly related to the activity of gamma-GT.

L-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide+glycylglycine  $\xrightarrow{\gamma\text{-GT}}$   
L-γ-glutamyl-glycylglycine + 5-amino-2-nitrobenzoate

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### LINEARITY

The assay is linear up to a  $\Delta A/\text{min} = 0.20$ . That is 284 U/L (Substr. Start) and 232 U/L (Sample start). Above this concentration, dilute the sample 1+5 with NaCl solution (9 g/L sodium chloride in water) and re-assay multiplying the result by 6.

### PRECISION (at 37°C)

Intra-assay n = 20	Mean [U/L]	SD [U/L]	CV [%]
Sample 1	39.9	0.99	2.48
Sample 2	73.6	0.85	1.16
Sample 3	206	1.32	0.64

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

- The reagents contain sodium azide (0.95 g/L) as preservative. Do not swallow! Avoid contact with skin and mucous membranes.
- Take the necessary precautions for the use of laboratory reagents.

## WASTE MANAGEMENT

Please refer to local legal requirements.

## REFERENCES

- Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1<sup>st</sup> ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998.p.80-6.
- Persijn JP, van der Silk W. A new method for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum. J Clin Chem Clin Biochem 1976; 14:421-7.
- Szasz G. Gamma-Glutamyltransferase. In: Bergmeyer HU, Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim: Verlag Chemie, 1974, p. 757.
- Schumann G, Bonora R, Cerotti F, Féraud G et al. IFCC primary reference procedure for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 5: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. Clin Chem Lab Med 2002; 40:734-8
- Fischbach F, Zawta B. Age-dependent reference limits of several enzymes in plasma at different measuring temperatures. Klin Lab 1992;38:555-61.

Inter-assay n = 20	Mean [U/L]	SD [U/L]	CV [%]
Sample 1	41.5	0.62	1.49
Sample 2	72.3	0.61	0.85
Sample 3	205	0.74	0.36

## METHOD COMPARISON

A comparison between Biotechnica Gamma-GT, standardized to IFCC (y) and the IFCC reference reagent (x) using 51 samples gave following results:  
 $y = 1.005 x - 0.741 \text{ U/L}; r = 0.999$

A comparison between Biotechnica Gamma-GT, Szasz (y) and a commercially available test (x) using 51 samples gave following results:  $y = 0.996 x + 1.354 \text{ U/L}; r = 1.000$ .

## QUALITY CONTROL

All control sera with Gamma GT values determined by this method can be used.  
We recommend:

REF	Cont.
481	6 x 5 ml Control serum normal
482	6 x 5 ml Control serum pathologic

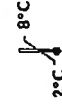
## CALIBRATION

The use of a Gamma GT Calibrator is optional.  
We recommend:

REF	Cont.
483	3 x 3 ml Multi calibration serum

## AUTOMATION

Special adaptations for automated analyzers can be made on request.

2°C 

IVD 



Biotechnica Instruments S.p.A., Via Licenza 18,  
00156 Rome (Italy)  
Tel. (+39) 06 411 2316 Fax: (+39) 06 410 3079  
E-mail: [bf@biotechnica.it](mailto:bf@biotechnica.it) Website: [www.biotechnica.it](http://www.biotechnica.it)

# ALBUMIN liquicolor

## Dosage colorimétrique photométrique de l'albumine

### Méthode au vert de bromocrésol (BCG)

#### Présentation

<b>REF</b>	10560	1 x 1000 ml	Kit complet
	156004	4 x 100 ml	Kit complet

#### IVD

#### Principe<sup>1,2</sup>

En solution de tampon citraté, l'albumine réagit avec le vert de bromocrésol (BCG) en formant un complexe coloré.

L'absorbance de ce complexe est proportionnelle à la concentration d'albumine dans l'échantillon.

#### Réactifs

<b>RGT</b>	4 x 100 ml ou 1 x 1000 ml Réactif de coloration	
	Tampon citraté (pH 4,2)	30 mmol/l
	Vert de bromocrésol	260 µmol/l

<b>STD</b>	1 x 3 ml Etalon	
	Albumine	4 g/dl ou 40 g/l
	Sodium azide	0,095 %

**STD** est standardisé par rapport au matériel de référence certifié CRM-DA470k/IFCC.

#### Préparation

**RGT** et **STD** sont prêts à l'emploi.

#### Stabilité

**RGT** et **STD** stockés à 2...25°C sont stables jusqu'à la date de péremption.

Éviter la contamination après ouverture.

#### Echantillons

Sérum ou plasma recueilli sur héparine ou EDTA.

Stabilité dans le sérum: à 2...8°C: jusqu'à 1 mois.  
à 15...25°C: jusqu'à 1 semaine.

#### Mode opératoire

Longueur d'onde: Hg 546 nm, 578 nm  
Épaisseur de la cuve: 1 cm.  
Température: 20...25°C.  
Zéro de l'appareil: Blanc réactif, utiliser un seul blanc par série.

#### Procédure

Introduire dans des tubes		
	Blanc réactif	Echantillon ou <b>STD</b>
Echantillon ou <b>STD</b>	---	10 µl
<b>RGT</b>	1000 µl	1000 µl

Mélanger. Incuber 5 min à 20...25°C. Mesurer l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon contre un blanc. Stabilité de la réaction: 30 min.

#### Calcul

$$C = 4 \times \frac{\Delta A_{\text{éch.}}}{\Delta A_{\text{STD}}} \quad [\text{g/dl}]$$

ou

$$C = 40 \times \frac{\Delta A_{\text{éch.}}}{\Delta A_{\text{STD}}} \quad [\text{g/l}]$$

#### Le facteur de conversion

Afin de convertir les résultats obtenus aux concentrations HUMAN utilisées antérieurement, appliquer l'équation suivante :

$$\text{Concentration (CRM 470)} \times 1,218 = \text{Concentration (Human)}$$

#### Caractéristiques typiques

##### Linéarité

Le test est linéaire jusqu'à une concentration en albumine de 6,5 g/dl ou 65 g/l. Si la concentration d'albumine est plus élevée, diluer l'échantillon avec de la saline physiologique (0,9%): 1 volume échantillon + 1 volume saline physiologique. Multiplier le résultat par 2.

Pour les performances de ce test, veuillez consulter la fiche technique accessible sur

[www.human.de/data/gb/vr/su-albu.pdf](http://www.human.de/data/gb/vr/su-albu.pdf) ou

[www.human-de.com/data/gb/vr/su-albu.pdf](http://www.human-de.com/data/gb/vr/su-albu.pdf)

##### Valeurs usuelles dans le sérum ou le plasma

3,8 à 5,1 g/dl ou 38 à 51 g/l.

##### Contrôle de qualité

Tous les sérums de contrôle de qualité avec des valeurs déterminées par cette méthode peuvent être utilisés.

Nous recommandons l'utilisation de nos sérums de contrôle de qualité d'origine animale HumaTrol ou d'origine humaine SERODOS.

##### Adaptations sur automatés

Des suggestions pour l'application des réactifs sur des analyseurs sont disponibles sur demande. Chaque laboratoire doit valider l'application sous sa propre responsabilité.

##### Notes

- Les valeurs de la bilirubine jusqu'à 20 mg/dl n'influencent pas ce test. Chaque 100 mg/dl d'hémoglobine entraînent une augmentation de 0,1 g/dl. Une hémolyse importante est à éviter.
- Les hémolyses importantes et les sérums lipémiques sont à l'origine d'interférences. Dans ce cas, un blanc échantillon doit être déterminé de la manière suivante : échantillon 10 µl, eau physiologique 1000 µl. La mesure se fait contre l'eau distillée – soustraire l'absorbance de ce blanc échantillon de l'absorbance de l'échantillon.
- Le réactif de coloration et l'étalon contiennent de l'azide de sodium. Ne pas avaler. Éviter le contact avec la peau et les muqueuses.

##### Bibliographie

- Rodkey F. L., Clin. Chem. **10**, 606 (1964)
- Doumas B. T. et al., Clin. Chim. Acta **31**, 87 (1971)

SU-ALBU

INF 156001 F

06-2012-17



# Human

# ALBUMIN liquicolor

## Prueba fotométrica colorimétrica para albúmina Método BCG

### Presentación del estuche

<b>[REF]</b>	10560	1 x 1000 ml	Estuche completo
	156004	4 x 100 ml	Estuche completo

### [IVD]

### Método<sup>1,2</sup>

El verde de bromocresol forma con la albúmina en buffer de citrato un complejo coloreado. La absorbancia de este complejo es directamente proporcional a la concentración de la albúmina en la muestra.

### Contenidos

<b>[RGT]</b>	4 x 100 ml ó 1 x 1000 ml Reactivo de color	30 mmol/l
	Buffer citrato (pH 4,2)	260 µmol/l
	Verde de bromocresol	

<b>[STD]</b>	1 x 3 ml Patrón	4 g/dl ó 40 g/l
	Albúmina	0,095 %
	Azida de sodio	

**[STD]** se estandarizó con respecto al material de referencia certificado CRM-DA470k/IFCC.

### Preparación de reactivos

**[RGT]** y **[STD]** están listos para usar.

### Estabilidad de los reactivos

**[RGT]** y **[STD]** son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan de 2...25°C.

Después de abiertos debe evitarse la contaminación.

### Muestras

Suero, plasma con EDTA ó heparina.

Estabilidad en suero: de 2...8°C hasta 1 mes,  
de 15...25°C hasta 1 semana.

### Ensayo

Longitud de onda: Hg 546 nm, 578 nm

Paso de luz: 1 cm

Temperatura: 20...25°C

Medición: Frente a un blanco de reactivo.

Se requiere un blanco de reactivo por serie.

### Esquema de pipeteo

Pipetee en las cubetas		
	Blanco de reactivo	Muestra ó <b>[STD]</b>
Muestra / <b>[STD]</b>	---	10 µl
<b>[RGT]</b>	1000 µl	1000 µl

Mezcle, incube por 5 minutos de 20...25°C. Mide la absorbancia de la muestra y del patrón frente al blanco de reactivo antes de 30 minutos (ΔA).

### Cálculo de la concentración de la albúmina

$$C = 4 \times \frac{\Delta A_{\text{muestra}}}{\Delta A_{\text{[STD]}}} \text{ [g/dl]}$$

ó

$$C = 40 \times \frac{\Delta A_{\text{muestra}}}{\Delta A_{\text{[STD]}}} \text{ [g/l]}$$

### Factor de conversión

Para convertir los resultados obtenidos en concentraciones HUMAN utilizadas anteriormente, aplique la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (CRM 470)} \times 1,218 = \text{Concentración (Human)}$$

### Características de la ejecución

#### Linealidad

La prueba es lineal hasta concentraciones de albúmina de 6,5 g/dl ó 65 g/l. Para concentraciones más elevadas diluya la muestra 1+1 con solución salina fisiológica (NaCl 0,9%). Multiplique el resultado por 2.

Las características de la ejecución de esta prueba pueden consultarse en el informe de verificación, accesible vía:

[www.human.de/data/gb/vr/su-albu.pdf](http://www.human.de/data/gb/vr/su-albu.pdf) o

[www.human-de.com/data/gb/vr/su-albu.pdf](http://www.human-de.com/data/gb/vr/su-albu.pdf)

### Valores de referencia en suero o plasma

3,8 – 5,1 g/dl ó 38 – 51 g/l

### Control de calidad

Pueden ser empleados todos los sueros con valores determinados por este método. Recomendamos el uso de nuestro suero de origen animal HumaTrol o nuestro suero de origen humano SERODOS.

### Automatización

Proposiciones para la aplicación de los reactivos sobre analizadores están disponibles sobre demanda. Cada laboratorio tiene que validar la aplicación en su propia responsabilidad.

### Notas

1. La prueba no es influenciada por valores de bilirrubina hasta 20 mg/dl. Por cada 100 mg/dl de hemoglobina se observa un incremento de albúmina de 0,1 g/dl, por lo que debe evitarse la hemólisis marcada.
2. La hemólisis y la lipemia marcada interfieren. Se debe realizar un blanco de muestra pipeteando 10 µl de muestra con 1000 µl de solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) y medirse frente a agua destilada. La absorbancia de este blanco de muestra debe restarse a la absorbancia de la muestra.
3. El reactivo de color y el patrón contienen azida de sodio. No ingiéralos. Evite el contacto con la piel y las membranas mucosas.

### Literatura

1. Rodkey F. L., Clin. Chem. **10**, 606 (1964)
2. Doumas B. T. *et al.*, Clin. Chim. Acta **31**, 87 (1971)

SU-ALBU INF 156001 E 06-2012-17



# Human