



HAL
open science

Utilisation des hépatocytes en culture pour le criblage toxico-pharmacologique de substances naturelles hépatotropes

Pierre-Yves Arvis

► **To cite this version:**

Pierre-Yves Arvis. Utilisation des hépatocytes en culture pour le criblage toxico-pharmacologique de substances naturelles hépatotropes. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1989. Français. NNT : 1989METZ004S . tel-01776877

HAL Id: tel-01776877

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776877v1>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

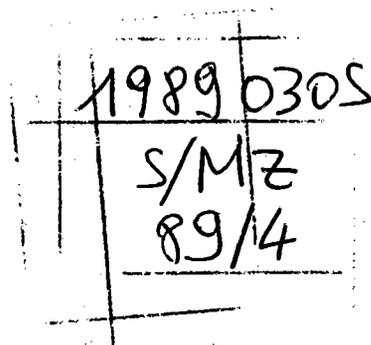
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE METZ
CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Thèse de Doctorat de l'Université de Metz
Mention Sciences - option Toxicologie



**UTILISATION DES HEPATOCYTES EN CULTURE
POUR LE CRIBLAGE TOXICO-PHARMACOLOGIQUE
DE SUBSTANCES NATURELLES HEPATOTROPES**

présentée et soutenue publiquement le 4 juillet 1989
par : Pierre-Yves ARVIS

Membres du jury :

J.M. PELT, Professeur (Président du jury)
A.M. BATT, Professeur (Rapporteur)
J. FLEURENTIN, Maître de conférences
D. GOUY, Docteur Vétérinaire (rapporteur)
F. MORTIER, Professeur (Directeur de thèse)
J.J. SERRANO, Professeur (Rapporteur)

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 486099 0

Pour P'pa Georges et M' man Lizou,

Thèse débütée au coin du feu à la Sammerois
Merci de m' avoir tenu les pouces si longtemps ...
et tant pis pour les orthèses.

Bien affectueusement.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, cursive letter 'M' followed by a horizontal line extending to the right.

A mon épouse Christine.

Je voudrais remercier :

Monsieur le Professeur J-M. PELT,
Président de l'Institut Européen d'Ecologie et Directeur du laboratoire de Biologie Végétale et Pharmacognosie du Centre des Sciences de l'Environnement à Metz, pour m'avoir accueilli avec bienveillance dans son équipe au sein de laquelle ces travaux ont débuté et pour avoir accepté de présider ce jury.

Monsieur le Professeur F. MORTIER,
Professeur de Pharmacognosie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nancy I, pour avoir dirigé ce travail et m'avoir apporté compétences et soutien dans les bons comme dans les mauvais moments.

Mademoiselle le Professeur A-M. BATT,
Professeur de Toxicologie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nancy I, qui m'a "initié" aux processus de la lipopéroxidation dans son enseignement du D.E.A. de Toxicologie de Metz, pour avoir accepté de juger ce mémoire et d'en être rapporteur.

Monsieur le Docteur D. GOUY,
Directeur du Service Commun de Toxicologie du Centre de Recherches Sanofi à Montpellier, qui a accepté de faire partie de ce jury et d'être rapporteur de ce mémoire en dépit de ses lourdes tâches.

Monsieur le Docteur J. FLEURENTIN,
Président de la Société Française d'Ethnopharmacologie et Maître de Conférence au laboratoire de Biologie Végétale et Pharmacognosie du Centre des Sciences de l'Environnement à Metz, pour m'avoir bien souvent éclairé par ses conseils et pour sa participation à ce jury.

Monsieur le Professeur J-J. SERRANO,
Professeur de Pharmacodynamie à la Faculté de Pharmacie de Montpellier, d'avoir répondu favorablement à notre invitation et pour l'honneur qu'il nous fait en faisant partie de ce jury et d'avoir accepté d'être rapporteur.

Je voudrais remercier également tous ceux et celles qui m'ont aidé au cours de ces années :

* Au Centre des Sciences de l'Environnement à Metz

Mademoiselle le Professeur P. VASSEUR qui a toujours trouvé des moments pour me conseiller et me faire profiter de ses compétences.

Monsieur le Docteur P. LEHR pour sa contribution aux essais de microscopie électronique à balayage.

Monsieur le Professeur J-C BLOCK, pour son sens aigu de la critique positive.

L'équipe des collègues Thésards de la Pharmaco., le "petit" Alain ROLLAND, Dominique BEAUX, Claire HOEFFLER, Marie-Claire LANHERS, Annette LEXA et Michel JOYEUX qui continue à maltraiter les hépatocytes.

Les collègues Thésards des autres labos avec une mention particulière à Véronique THARREAU et Jean-Pierre FLAMBEAU dont l'amitié fut souvent un secours.

Les membres permanents qui par leur gentillesse savent créer un esprit familial.

* Au Service Commun de Toxicologie de SANOFI Recherches à Montpellier

Monsieur le Docteur P. VIC qui a toujours su se rendre disponible et me prodiguer ses conseils éclairés pour que ce travail aboutisse.

Mademoiselle le Docteur N. BICHET qui m'a enseigné l'art et la manière de cultiver les cellules et de les soumettre aux pires sévices.

L'équipe de la Section de Toxicogénétique Monique BONNERY, Catherine COHEN-SOLAL, Anne-Françoise PELLOUX et Nathalie RAOUST.

Monsieur le Docteur-Ingénieur B. BASUYAUX et ses techniciennes à qui l'ont doit la mise au point et la réalisation des dosages de l'albumine.

Les différents membres des sections du Service de Toxicologie dont bon nombre d'entre eux ont apporté leur contribution à ces travaux.

Madame René RAMUALDE avec qui j'ai longtemps partagé son bureau et qui m'a beaucoup donné par ses conseils et son amitié.

Je réserverais une place toute particulière à Patrice FRANCOUR, pour qui le sens aigü de l'amitié passe au delà de tous les sacrifices.

SOMMAIRE

PAGES

AVANT PROPOS.

1. INTRODUCTION.	1
2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.	6
21. LES MODELES TOXICO-PHARMACOLOGIQUES <i>in vitro</i> .	6
22. LES HEPATOTOXIQUES.	10
221. LE TETRACHLORURE DE CARBONE.	11
222. LA D-GALACTOSAMINE.	21
23. LES HEPATOTROPES.	26
3. MATERIEL ET METHODES.	34
31. PREPARATIONS DES EXTRAITS DE PLANTES.	34
311. EXTRAITS AQUEUX BRUTS D' <i>Eupatorium cannabinum</i> .	34
3111. L'EXTRAIT E 5141-3A.	34
3112. L'EXTRAIT RT 1096.	34
312. EXTRAIT PURIFIE DE <i>Silybum marianum</i>	35
32. PREPARATION DES HEPATOCYTES <i>in vitro</i> ET TRAITEMENTS.	36
321. HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION.	36
3211. METHODE D'OBTENTION.	36
3212. TESTS DE CYTOTOXICITE.	37
3213. TESTS DE PROTECTION.	38
32131. TRAITEMENT SIMULTANE.	38
32132. TRAITEMENT PREVENTIF.	38
322. HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE.	39
3221. METHODE D'OBTENTION.	39
3222. TESTS DE CYTOTOXICITE.	40

32221. METHODE CLASSIQUE.	40
32222. MICROMETHODE.	41
3223. TESTS DE PROTECTION.	41
32231. TRAITEMENT SIMULTANE.	41
32232. TRAITEMENT PREVENTIF.	41
323. HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE.	42
3231. METHODE D'OBTENTION.	42
3232. TESTS DE CYTOTOXICITE.	42
3233. TESTS DE PROTECTION.	43
33. DOSAGES BIOCHIMIQUES ET COLORIMETRIQUES.	45
331. TEST D'EXCLUSION DU BLEU TRYPAN.	45
332. DOSAGES ENZYMATIQUES.	46
3321. HEPATOCYTES EN SUSPENSION.	46
3322. HEPATOCYTES EN CULTURE PRIMAIRE.	47
333. DOSAGES DES PROTEINES TOTALES	48
3331. METHODE DE COLORATION DE LOWRY.	48
3332. METHODE DE COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE.	49
334. TEST DE COLORATION AU ROUGE NEUTRE.	50
335. TEST DE COLORATION AU MTT.	52
336. DOSAGE DE L'ALBUMINE.	53
3361. DOSAGE DE L'ALBUMINE DE RAT.	53
3362. DOSAGE DE L'ALBUMINE HUMAINE.	56
34. OBSERVATIONS CYTOMORPHOLOGIQUES.	58
341. MICROSCOPIE PHOTONIQUE.	58
342. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.	59
3421. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.	59
3422. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION.	60
35. ANALYSES STATISTIQUES DES RESULTATS.	61

4. RESULTATS.	63
41. CYTOTOXICITE DE 2 PRODUITS DE REFERENCE : LE TETRACHLORURE DE CARBONE ET LA D-GALACTOSAMINE.	63
411. HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION.	63
4111. EFFET/DOSE DU CCl4 DURANT 30 MINUTES.	63
4112. CINETIQUE D'ACTION TOXIQUE DU CCl4 8mM.	69
4113. INTERACTIONS ENTRE LE CCl4 ET 2 TIERS SOLVANTS.	74
41131. INTERACTION ENTRE LE CCl4 ET L'ETHANOL.	75
41132. INTERACTION ENTRE LE CCl4 ET LE DMSO.	82
412. HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE.	90
4121. CYTOTOXICITE DU CCl4.	90
4122. CYTOTOXICITE DE LA D-GALACTOSAMINE.	95
41221. CYTOTOXICITE DIRECTE DE LA D-GALACTOSAMINE.	95
41222. INFLUENCE DU SERUM DE VEAU SUR LA CYTOTOXICITE DIRECTE DE LA D-GALACTOSAMINE.	97
41223. CYTOTOXICITE RETARDEE DE LA D-GALACTOSAMINE.	99
413. HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE : CYTOTOXICITE RETARDEE DE LA D-GALACTOSAMINE.	105
42. RECHERCHE D'UNE EVENTUELLE CYTOTOXICITE DES EXTRAITS DE PLANTE <i>in vitro</i> DANS LES HEPATOCYTES EN CULTURE.	110
421. HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION.	110
4211. CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT E 5141-3A.	110
4212. CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT RT 1096.	112
422. HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE.	114
4221. MODELE CLASSIQUE.	114
42211. CYTOTOXICITE DES EXTRAITS AQUEUX D'EUPATOIRE : E 5141-3A et RT 1096.	114
42212. CYTOTOXICITE DE LA SILIMARINE.	119
4222. MICROMETHODE.	125
42221. CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT E 5141-3A.	125

42222. CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT RT 1096.	133
423. HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE.	140
4231. CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT E 5141-3A.	140
4232. CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT RT 1096.	145
43. INFLUENCE DES EXTRAITS D' <i>Eupatorium cannabinum</i> L. SUR LA CYTOTOXICITE DE 2 PRODUITS DE REFERENCE : LE TETRACHLORURE DE CARBONE ET LA D-GALACTOSAMINE.	150
431. HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION.	150
4311. INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA TOXICITE DU CC14 EN TRAITEMENT SIMULTANE DURANT 30 MINUTES.	150
4312. INFLUENCE DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA TOXICITE DU CC14 EN TRAITEMENT SIMULTANE DURANT 60 MINUTES.	152
4313. INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA TOXICITE DU CC14 EN TRAITEMENT PREVENTIF.	154
4314. INFLUENCE DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA TOXICITE DU CC14 EN TRAITEMENT PREVENTIF.	160
432. HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE.	162
4321. INFLUENCE DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA TOXICITE DU CC14 EN TRAITEMENT PREVENTIF.	162
4322. INFLUENCE DES EXTRAITS E 5141-3A et RT 1096 SUR LA TOXICITE DE LA D-GALACTOSAMINE EN TRAITEMENT SIMULTANE.	164
433. HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE : INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA TOXICITE DE LA D-GALACTOSAMINE EN TRAITEMENT SIMULTANE.	167
5. DISCUSSION.	173
51. JUSTIFICATION DU CHOIX DES ESPECES ET DES MARQUEURS.	174
511. LES ESPECES.	174
512. LES MARQUEURS DE LA CYTOTOXICITE.	175
52. CYTOTOXICITE DES PRODUITS DE REFERENCE.	178
521. LE TETRACHLORURE DE CARBONE.	179
522. LA D-GALACTOSAMINE.	182

53. CYTOTOXICITE DES EXTRAITS DE PLANTES	184
54. RECHERCHE D'UN EFFET HEPATOTROPE DES EXTRAITS D'EUPATOIRE.	188
6. CONCLUSION.	193
7. BIBLIOGRAPHIE.	198
8. ANNEXES.	212

INDEX DES FIGURES

	PAGES
<u>Figure 1</u> :	23
METABOLISME DE LA D-GALACTOSAMINE.	
<u>Figure 2</u> :	35
STRUCTURE CHIMIQUE DES ISOMERES COMPRIS DANS LA SILYMARINE.	
<u>Figure 3</u> :	44
PROTOCOLES D'ETUDE DES SUBSTANCES CYTOTOXIQUES OU HEPATOTROPES POUVANT ETRE TESTEES DANS LES MODELES D'HEPATOCYTES EN CULTURE.	
<u>Figure 4</u> :	65
EFFET DU CCL4 SUR LA FUIITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Figure 5</u> :	66
EFFET DU CCL4 SUR LA FUIITE DE L'ENZYME GPT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Figure 6</u> :	67
EFFET DU CCL4 SUR LA FUIITE DE L'ENZYME GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Figure 7</u> :	70
EFFET DU CCL4 8 mM SUR LA FUIITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 120 MINUTES.	
<u>Figure 8</u> :	71
EFFET DU CCL4 8 mM SUR LA FUIITE DE L'ENZYME GPT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 120 MINUTES.	
<u>Figure 9</u> :	72
EFFET DU CCL4 8 mM SUR LA FUIITE DE L'ENZYME GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 120 MINUTES.	
<u>Figure 10</u> :	77
EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET L'ETHANOL SUR LA FUIITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	

<u>Figure 11</u> :	78
EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET L'ETHANOL SUR LA FUIE DE L'ENZYME GPT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Figure 12</u> :	79
EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET L'ETHANOL SUR LA FUIE DE L'ENZYME GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Figure 13</u> :	85
EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET LE DMSO SUR LA FUIE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Figure 14</u> :	86
EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET LE DMSO SUR LA FUIE DE L'ENZYME GPT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Figure 15</u> :	87
EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET LE DMSO SUR LA FUIE DE L'ENZYME GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Figure 16</u> :	91
EFFET DU CCL4 SUR LA FUIE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 60 MINUTES.	
<u>Figure 17</u> :	92
EFFET DU CCL4 SUR LA FUIE DE L'ENZYME GPT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 60 MINUTES.	
<u>Figure 18</u> :	93
EFFET DU CCL4 SUR LA FUIE DE L'ENZYME GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 60 MINUTES.	
<u>Figure 19</u> :	100
EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUIE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 96 HEURES.	

<u>Figure 20</u> :	103
EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUIE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.	
<u>Figure 21</u> :	106
EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUIE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 96 HEURES.	
<u>Figure 22</u> :	108
EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA SECRETION D'ALBUMINE DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 96 HEURES.	
<u>Figure 23</u> :	120
EFFET DE LA SILYMARINE SUR LA FUIE DE LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 24</u> :	121
EFFET DE LA SILYMARINE SUR LA FUIE DE LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 25</u> :	122
EFFET DE LA SILYMARINE SUR LA FUIE DE GPT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 26</u> :	123
EFFET DE LA SILYMARINE SUR LA FUIE DE GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 27</u> :	127
EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUIE DE LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 28</u> :	128
EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA COLORATION DES LYSOSOMES PAR LE ROUGE NEUTRE DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 29</u> :	129
EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA CAPACITE DE REDUCTION DU MTT PAR LES MITOCHONDRIES DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.	

<u>Figure 30</u> :	130
EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA QUANTITE DE PROTEINES TOTALES DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 31</u> :	131
EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA CAPACITE DE SYNTHESE D'ALBUMINE DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 32</u> :	134
EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUIITE DE LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 33</u> :	135
EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA COLORATION DES LYSOSOMES PAR LE ROUGE NEUTRE DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 34</u> :	136
EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA CAPACITE DE REDUCTION DU MTT PAR LES MITOCHONDRIES DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 35</u> :	137
EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA QUANTITE DE PROTEINES TOTALES DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 36</u> :	138
EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA CAPACITE DE SYNTHESE D'ALBUMINE DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 37</u> :	141
EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUIITE DE LDH DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.	
<u>Figure 38</u> :	142
EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUIITE DE GPT DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.	

<u>Figure 39</u> :	143
EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUIITE DE GOT DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.	
<u>Figure 40</u> :	146
EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUIITE DE LDH DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 41</u> :	147
EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUIITE DE GPT DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 42</u> :	148
EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUIITE DE GOT DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 24 HEURES.	
<u>Figure 43</u> :	155
INFLUENCE DU TEMPS DE PRETRAITEMENT PAR L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUIITE DE L'ENZYME LDH INDUITE PAR LE CCL4 8 mM/DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION INTOXIQUES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Figure 44</u> :	156
INFLUENCE DU TEMPS DE PRETRAITEMENT PAR L'EXTARIT E 5141-3A SUR LA FUIITE DE L'ENZYME GPT INDUITE PAR LE CCL4 8 mM/DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION INTOXIQUES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Figure 45</u> :	157
INFLUENCE DU TEMPS DE PRETRAITEMENT PAR L'EXTARIT E 5141-3A SUR LA FUIITE DE L'ENZYME GOT INDUITE PAR LE CCL4 8 mM/DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION INTOXIQUES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Figure 46</u> :	168
INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A EN TRAITEMENT SIMULTANE SUR LA FUIITE DE L'ENZYME LDH INDUITE PAR LA D-GALACTOSAMINE 5 mM DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.	
<u>Figure 47</u> :	169
INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A EN TRAITEMENT SIMULTANE SUR LA FUIITE DE L'ENZYME GPT INDUITE PAR LA D-GALACTOSAMINE 5 mM DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.	
<u>Figure 48</u> :	170
INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A EN TRAITEMENT SIMULTANE SUR LA FUIITE DE L'ENZYME GOT INDUITE PAR LA D-GALACTOSAMINE 5 mM DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.	

<u>Figure 49</u> :	221
TITRAGE DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-ALBUMINE DE RAT.	
<u>Figure 50</u> :	222
DROITE STANDARD D'ETALONNAGE DE L'ALBUMINE DE RAT.	
<u>Figure 51</u> :	223
DROITES STANDARDS D'ETALONNAGE DE L'ALBUMINE DE RAT.	
<u>Figure 52</u> :	224
DROITES STANDARDS D'ETALONNAGE DE L'ALBUMINE DE RAT.	
<u>Figure 53</u> :	230
TITRAGE DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-ALBUMINE HUMAINE.	
<u>Figure 54</u> :	231
DROITE STANDARD D'ETALONNAGE DE L'ALBUMINE HUMAINE.	

INDEX DES TABLEAUX

PAGES

<u>Tableau I</u> :	9
HEPATOCYTES ISOLES EN CULTURE - LES MODELES - LEURS POSSIBILITES ET LEURS LIMITES.	
<u>Tableau II</u> :	68
EFFET DU CCL4 SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Tableau III</u> :	73
EFFET DU CCL4 8 mM SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 120 MINUTES.	
<u>Tableau IV</u> :	80
EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET L'ETHANOL SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Tableau V</u> :	81
VALEURS THEORIQUES CALCULEES PAR MODELISATION AU MOYEN D'UNE REGRESSION MULTIPLE POUR LA MESURE DE LA FUITE DES ENZYMES LDH ET GPT PROVOQUEE PAR L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET L'ETHANOL DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Tableau VI</u> :	88
EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET LE DMSO SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Tableau VII</u> :	89
VALEURS THEORIQUES CALCULEES PAR MODELISATION AU MOYEN D'UNE REGRESSION MULTIPLE POUR LA MESURE DE LA FUITE DES ENZYMES LDH ET GPT PROVOQUEE PAR L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET LE DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Tableau VIII</u> :	94
EFFET DU CCL4 SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 60 MINUTES.	

<u>Tableau IX</u> :	96
EFFET DIRECT DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUIE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Tableau X</u> :	98
INFLUENCE DU SERUM DE VEAU NOUVEAU NE SUR LA CYTOTOXICITE DIRECTE DE LA D-GALACTOSAMINE DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 29 HEURES.	
<u>Tableau XI</u> :	101
EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUIE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 96 HEURES.	
<u>Tableau XII</u> :	104
EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUIE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.	
<u>Tableau XIII</u> :	107
EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUIE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 96 HEURES.	
<u>Tableau XIV</u> :	109
EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA SECRETION D'ALBUMINE DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 96 HEURES.	
<u>Tableau XV</u> :	111
EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUIE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Tableau XVI</u> :	113
EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUIE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 60 MINUTES.	
<u>Tableau XVII</u> :	116
EFFET DES EXTRAITS E 5141-3A ET RT 1096 SUR LA FUIE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.	

<u>Tableau XVIII</u> :	117
OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION DE LA CYTOTOXICITE DES EXTRAITS E 5141-3A ET RT 1096 DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Tableau XIX</u> :	124
EFFET DE LA SILYMARINE SUR LA FUIITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Tableau XX</u> :	132
EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Tableau XXI</u> :	139
EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.	
<u>Tableau XXII</u> :	144
EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUIITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.	
<u>Tableau XXIII</u> :	149
EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUIITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 24 HEURES.	
<u>Tableau XXIV</u> :	151
INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUIITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LE CCL4 4 mM / DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION EN TRAITEMENT SIMULTANE DURANT 30 MINUTES.	
<u>Tableau XXV</u> :	153
INFLUENCE DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUIITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LE CCL4 10 mM / ETHANOL DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION EN TRAITEMENT SIMULTANE DURANT 60 MINUTES.	
<u>Tableau XXVI</u> :	158
INFLUENCE DU TEMPS DE PRETRAITEMENT PAR L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUIITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LE CCL4 8 mM / DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION INTOXIQUES DURANT 30 MINUTES.	

<u>Tableau XXVII</u> :	159
INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A EN PRETRAITEMENT DE 30 MINUTES SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LE CCL4 8 mM / DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION INTOXIQUES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Tableau XXVIII</u> :	161
INFLUENCE DE L'EXTRAIT RT 1096 EN PRETRAITEMENT DE 30 MINUTES SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LE CCL4 8 mM / DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION INTOXIQUES DURANT 30 MINUTES.	
<u>Tableau XXIX</u> :	163
INFLUENCE DE L'EXTRAIT RT 1096 EN PRETRAITEMENT DE 29 HEURES SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LE CCL4 10 mM / DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE INTOXIQUES DURANT 60 MINUTES.	
<u>Tableau XXX</u> :	165
INFLUENCE DES EXTRAITS E 5141-3A ET RT 1096 SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LA D-GALACTOSAMINE 5 mM DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN TRAITEMENT SIMULTANE.	
<u>Tableau XXXI</u> :	171
INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A EN TRAITEMENT SIMULTANE SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LA D-GALACTOSAMINE 5 mM DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.	
<u>Tableau XXXII</u> :	187
SYNTHESE COMPARATIVE DE L'EFFET DE 2 EXTRAITS AQUEUX D'EUPATORIUM CANNABINUM L. SUR DIFFERENTS MODELES IN VITRO D'HEPATOCYTES EN CULTURE.	
<u>Tableau XXXIII</u> :	192
INFLUENCE DES EXTRAITS AQUEUX BRUTS D'EUPATOIRE E 5141-3A ET RT 1096 SUR L'INTOXICATION PAR DES MOLECULES DE REFERENCE D'HEPATOCYTES ISOLES EN CULTURE SELON DIVERS MODELES.	
<u>Tableau XXXIV</u> :	233
RECHERCHE DE LA DL 50 DE L'EXTRAIT E 5141-3A CHEZ LA SOURIS MALE.	
<u>Tableau XXXV</u> :	234
RECHERCHE DE LA DL 50 DE L'EXTRAIT E 5141-3A CHEZ LA SOURIS FEMELE.	

Tableau XXXVI :

235

RECHERCHE DE LA DL 50 DE L'EXTRAIT RT 1096 CHEZ LA SOURIS MALE.

Tableau XXXVII :

236

RECHERCHE DE LA DL 50 DE L'EXTRAIT RT 1096 CHEZ LA SOURIS FEMELE.

LISTE DES ABREVIATIONS

AMM	= Autorisation de mise sur le marché
LDH	= Lactate déshydrogénase
GPT	= Glutamate pyruvate transaminase (ou ALAT)
GOT	= Glutamate oxaloacétate transaminase (ou ASAT)
DMSO	= Diméthylsulfoxyde
CCl4	= Tétrachlorure de carbone
Gal-NH2	= D-galactosamine
MDA	= Malonaldéhyde
MTT	= (3-(4,5-diméthylthiazol-2-ul)-2,5 diphenyltetrazolium bromide)
RN	= Rouge neutre
SAB	= Sérum albumine bovine
MFO	= système Mixte fonction oxydase
UTP	= Uridine triphosphate
RIA	= Radio Immuno Assay
CE 50	= Concentration provoquant 50 % de l'effet
DL 50	= dose létale 50
QSP	= Quantité suffisante pour
I.P.	= Intrapéritonéale
ul	= microlitre
ml	= millilitre
mUI	= milli unité internationale
mM	= millimolaire
mg PS/ml	= milligramme de plante sèche par millilitre
DO	= Densité optique
n	= nombre d'échantillons par lot
p	= risque de première espèce
ND	= non déterminé

AVANT PROPOS

Le travail que nous présentons dans cet exposé concrétise une collaboration entre le laboratoire de Biologie Végétale et Pharmacognosie du Centre des Sciences de l'Environnement à Metz, dirigé par le Professeur J-M PELT, le Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques de Nancy I, dirigé par le Professeur F MORTIER et le groupe industriel SANOFI (Centre de Recherches de Montpellier dirigé par le Professeur J-P CANO).

Une partie des expériences, faisant suite au travail que nous avons présenté et soutenu publiquement pour l'obtention du D.E.A. de Toxicologie de l'Université de Metz le 25 septembre 1985, a été réalisée dans le laboratoire de Biologie Végétale et Pharmacognosie du Centre des Sciences de l'Environnement à Metz durant l'année 1986. Une deuxième partie des expériences a été réalisée au cours des années 1987 et 1988 dans le laboratoire de Toxicogénétiq ue dirigé par le Docteur N BICHET, laboratoire qui fait partie du service commun de Toxicologie du centre SANOFI Recherches à Montpellier alors dirigé par le Docteur P VIC et aujourd'hui dirigé par le Docteur D GOUY.

Ce travail constitue une approche nouvelle pour l'étude de plantes médicinales au moyen de tests *in vitro* sur hépatocytes en culture. Il vient compléter des résultats obtenus par des méthodes toxico-pharmacologiques "classiques" *in vivo*, reconnues et déterminantes pour l'autorisation de mise sur le marché de spécialités pharmaceutiques nouvelles.

1. INTRODUCTION.

Pour permettre la mise sur le marché d'un nouveau médicament à des fins thérapeutiques chez l'homme, le législateur doit statuer notamment sur un dossier toxicologique et pharmacologique faisant partie du dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM). La commercialisation de préparations d'origines naturelles devra elle aussi s'appuyer sur des tests expérimentaux afin de prouver leur innocuité et démontrer leur activité. Ceci doit fournir matière à la constitution d'un dossier d'AMM simplifié pour la mise sur le marché d'un phyto-médicament (VERAIN 1988).

Les modèles toxico-pharmacologiques *in vivo* représentent la démarche "classique" et sont toujours déterminants pour l'AMM de nouveaux produits mais ils nécessitent des manipulations nombreuses pas toujours prédictives et des investissements financiers importants. La toxicologie et la pharmacologie s'orientent actuellement de plus en plus vers les techniques *in vitro* sur les organes isolés comme sur les modèles de cultures de cellules. Les raisons en sont à la fois éthiques, scientifiques, économiques et politiques.

Alors que ces dernières années il était évoqué le terme de méthodes *in vitro* alternatives ou substitutives, il est aujourd'hui préférable de parler de méthodes complémentaires (GREEN 1988).

Les méthodes *in vitro* sur cultures de cellules sont plutôt adaptées et réservées au criblage précoce des molécules (screening pour les anglosaxons) car elles présentent les avantages suivants sur les méthodes *in vivo* :

- rapidité.
 - possibilité d'utiliser de petites quantités de substances à tester.
 - possibilité de disposer d'un grand nombre d'échantillons à partir d'un même animal.
 - coût inférieur aux méthodes *in vivo*.
- (GRISHAM et al.1978, GREIM 1980, KLASSEN et STACEY 1982, KRACK et al.1983, BENFORD et HUBBARD 1987).

Ce travail s'inscrit dans la continuité des recherches menées au Laboratoire de Biologie Végétale et Pharmacognosie du Centre des Sciences de l'Environnement à Metz conjointement associé au Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques de Nancy I. Ces recherches ont pour but d'infirmer ou de confirmer au moyen de tests scientifiques, les propriétés pharmacologiques d'extraits de plantes réputées actives selon l'analyse des données empiriques recueillies généralement sur le terrain. L'un des axes de recherches repose sur la mise en évidence d'activités hépatotropes de plantes médicinales (FLEURENTIN et al.1986, HOEFLER et al.1987).

Le foie est l'organe le plus actif d'un point de vue biochimique pour le métabolisme des substances endogènes et exogènes (xénobiotiques). Son rôle est essentiel dans le maintien de l'homéostasie biologique de l'organisme. Il intervient dans l'activation et la détoxification des substances chimiques. Les hépatocytes qui sont des cellules parenchymateuses, représentent environ 70 % du nombre total des cellules de cet organe et en assurent les fonctions essentielles.

Le dysfonctionnement de ces cellules peut être provoqué par différents types d'atteintes : toxiques, virales, médicamenteuses ou immunoallergiques (PERRISSOUD 1981).

Environ 600 préparations commerciales d'origine naturelle proposant une activité hépatotrope sont dénombrées au niveau mondial. Cependant, les informations scientifiques prouvant l'efficacité de ces plantes sont peu fréquentes et insuffisantes (HANDA et al.1986).

Parmi différentes plantes communes en Europe, *Eupatorium cannabinum* L. (Asteraceae) est bien connue depuis l'antiquité pour ses applications dans les traitements des ictères, des cholécystites et des plaies. Un extrait aqueux brut d'Eupatoire (EP 1001) dont la préparation galénique a été réalisé par SANOFI Recherches à Toulouse suivant les indications des fabrications traditionnelles, a montré un effet cholérétique et des propriétés hépatotropes sur plusieurs modèles pharmacologiques chez l'animal entier (LEXA et al.1988, LEXA-ROBIN 1988).

Le travail de recherches qui nous a été confié consiste en la mise au point de méthodes *in vitro* adaptées au criblage de substances naturelles hépatotropes. Ces méthodes de criblage *in vitro* sur des hépatocytes en culture, doivent être performantes, rapides, reproductibles et les plus prédictives possibles.

A ces fins, une application a été conduite sur 2 extraits aqueux bruts d'*Eupatorium cannabinum* L. (Asteraceae) réalisés par SANOFI Recherches : l'extrait E 5141-3A préparé conformément aux données empiriques et l'extrait RT 1096 réalisé suivant un procédé pilote semi-industriel devant aboutir à la production et à la commercialisation d'une spécialité pharmaceutique.

Après avoir mis au point un modèle de culture d'hépatocytes de rat en suspension (ARVIS 1985) dans le but de conduire des expériences à court terme, les résultats positifs obtenus alors nous ont encouragé à poursuivre ce travail. Cette suite fait l'objet de la présentation de ce mémoire. Nous en décrirons maintenant les points clés et le détail des adresses sera accessible au lecteur dans le sommaire.

Le travail expérimental s'articule en trois parties d'importance comparable. Cette "trichotomie" représente les phases essentielles du cheminement de l'approche méthodique

nécessaire à l'édification de modèles toxico-pharmacologiques susceptibles de mettre en évidence les vertues hépatotropes de substances nouvelles.

La première partie considère les tests pratiqués sur des produits toxiques de référence : le tétrachlorure de carbone (utilisé pour des expériences à court terme) et la D-galactosamine (utilisée pour des expériences à long terme). Cette partie était indispensable car il faut disposer de bons modèles cytotoxiques si l'on veut pouvoir ensuite cribler des substances hépatotropes. L'arborescence des travaux qui ont pu être réalisés est la suivante :

```

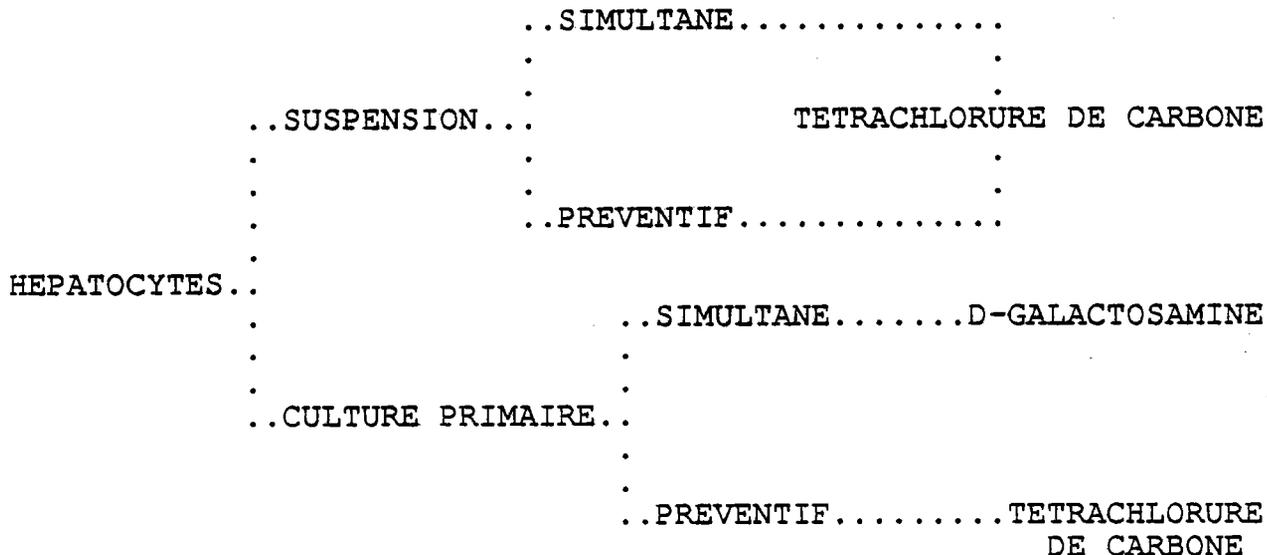
..SUSPENSION
.
..TETRACHLORURE DE CARBONE..
.
.
..CULTURE PRIMAIRE
.
HEPATOCYTES ..
.
.
..D-GALACTOSAMINE.....CULTURE PRIMAIRE
```

La seconde partie considère les tests de recherche d'une cytotoxicité de substances naturelles : deux extraits aqueux bruts d'*Eupatorium cannabinum* L. (Asteraceae) et un extrait purifié de *Silybum marianum* (Asteraceae). La recherche d'une éventuelle cytotoxicité des substances nouvelles, qu'elles soient d'origine naturelle ou de synthèse, et surtout si elles sont supposées présenter des vertues hépatotropes, est une précaution élémentaire et indispensable si l'on désire pouvoir donner une suite favorable au développement d'un produit nouveau. Cette réflexion constitue le fondement des études toxicologiques demandées dans le dossier d'expertise pour l'AMM dans lequel l'innocuité du produit doit être démontrée. L'arborescence des travaux qui ont pu être réalisés est la suivante :

```

..SUSPENSION
.
HEPATOCYTES..
.
..CLASSIQUE
.
..CULTURE PRIMAIRE...
.
..MICROCULTURE
```

La troisième partie considère les tests pratiqués pour la recherche d'éventuelles activités hépatotropes de deux extraits aqueux bruts d'*Eupatorium cannabinum* L. (Asteraceae) vis à vis des substances toxiques de référence ayant fait l'objet de la première partie i.e. le tétrachlorure de carbone (pour les tests à court terme) et la D-galactosamine (pour les tests à long terme). Les activités hépatotropes ont été recherchées soit lors de traitements simultanés soit lors de traitements préventifs. L'arborescence des travaux qui ont pu être réalisés est la suivante :



Les tests que nous avons développés ont utilisé non seulement plusieurs types de modèles de culture d'hépatocytes de rat mais encore des hépatocytes humains en culture primaire.

Nous avons utilisé le modèle d'hépatocytes de rat en suspension dans les études à court terme. Les hépatocytes de rat en culture primaire ont servi de modèle expérimental dans les études à moyen terme (24 heures) et long terme (3 à 4 jours). Nous avons pratiqué deux types de modèles : soit un modèle de culture primaire "classique" soit un modèle de microculture. Ce dernier modèle d'hépatocytes en microculture fait actuellement l'objet d'une étude multicentrique de validation dans un programme de la Communauté Economique Européenne. Enfin, l'usage des hépatocytes humains a été réservé à des tests en culture primaire "classique".

Les points majeurs du plan de thèse sont les suivants :

- a) Une introduction qui permet de définir le contexte qui a motivé ce travail ainsi que son déroulement.
- b) Une "analyse bibliographique" courte pour comparer les différents modèles in vitro, indiquer les caractéristiques principales du mode d'action des produits hépatotoxiques de référence que nous avons utilisés et quelques données sur les substances hépatotropes d'origine naturelles ayant fait l'objet d'études sur les hépatocytes isolés.
- c) Une partie matériel et méthodes la plus complète possible afin que le lecteur intéressé puisse éventuellement y trouver matière à construire d'autres recherches.
- d) Une partie "résultats" construite en suivant le plan de travail présenté précédemment et qui est constituée d'éléments biochimiques essentiels représentant des marqueurs de la cytotoxicité tels que : le test de viabilité au bleu Trypan, les dosages enzymatiques de LDH, GPT ou GOT, le dosage des protéines totales (méthode de Lowry et méthode bio-rad), les tests fonctionnels - des lysosomes (rouge neutre) - des mitochondries (MTT) - du réticulum endoplasmique (synthèse et sécrétion d'albumine) et complétée par des observations cytomorphologiques en microscopie optique à contraste de phase et en microscopie électronique à balayage et à transmission.
- e) Une discussion générale reprenant la synthèse des résultats et y apportant une analyse critique comparée.
- f) Une conclusion.

2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.

21. LES MODELES TOXICO-PHARMACOLOGIQUES *in vitro*.

L'hépatocyte représente à l'échelle cellulaire, l'unité fonctionnelle du foie.

Depuis ces 20 dernières années, de nombreuses méthodes ont été proposées pour isoler les hépatocytes de diverses espèces animales. Les résultats décrits sont très variables quant aux rendements (quantité de cellules isolées), à la viabilité des dits hépatocytes ainsi qu'au maintien de leurs fonctions spécifiques. Au regard de la chronologie, d'énormes progrès ont été établis dans le sens d'une constante amélioration quantitative d'une part et qualitative d'autre part.

Plusieurs époques marquent les évolutions techniques de la préparation des hépatocytes isolés.

La fin des années 60 marque l'époque "pionniers" pour laquelle il convient de citer les travaux de HOWARD et al. (1967), HOWARD et PESCH (1968) qui introduisent la technique de dissociation du foie par un système enzymatique. Cette technique est reprise et améliorée par les travaux de BERRY et FRIEND (1969) qui constituent encore aujourd'hui la méthode princeps de référence qui introduisit la perfusion du foie par une solution de collagénase et hyaluronidase.

Les années 70 marquent l'époque de l'amélioration du rendement et de la qualité des hépatocytes. On peut citer les travaux de SCHREIBER et SCHREIBER (1973), BERRY (1974), BERRY et WERNER (1974), KREBS et al. (1974), WAGLE et INGEBRETSEN (1975), JEEJEEBHOY et PHILLIPS (1976), FRY et al. (1976), BERRY (1976). Ce sont surtout les travaux de SEGLEN (1976) qui représentèrent une formidable progression méthodologique en introduisant la perfusion *in situ* par la collagénase seule avec recirculation du liquide dissociateur et optimisation des conditions expérimentales permettant d'obtenir ainsi un rendement important et une viabilité élevée. L'obtention d'hépatocytes isolés à partir de tranche de foie à encore ses protagonistes (BELLEMANN et al. (1977), GUSTAVSON et MORLAND (1980)).

Au cours des années 80, les auteurs se préoccupent surtout de l'amélioration des conditions de culture et des performances biochimiques des hépatocytes isolés. Les propositions sont nombreuses et variées et l'on peut citer certains travaux comme ceux de CARLSEN et al. (1981), CRESTO et al. (1981), STOJANOV et MAJKIC-SINGH (1982), GREEN et al. (1983), QUERAL et al. (1984), WANG et al. (1985).

En fait, il existe à peu près autant de techniques aux variations subtiles que de laboratoires et d'auteurs qui utilisent ces modèles d'hépatocytes isolés en culture mais ce sont surtout les travaux de BERRY et FRIEND (1969) puis de SEGLEN (1976) qui constituent les publications princeps auxquelles la majorité des auteurs se réfèrent.

Depuis quelques années, l'utilisation d'hépatocytes humains est devenue accessible aux chercheurs et les travaux de GUGUEN-GUILLOUZO et al. (1982) sont à notre connaissance les premières informations qui prônent la qualité sur ce modèle.

Au cours des 10 dernières années, une part de plus en plus importante a été réservée aux suspensions d'hépatocytes isolés par perfusion enzymatique (GUILLOUZO 1986).

Les suspensions d'hépatocytes isolés offrent l'avantage de constituer une population de cellules homogène et d'exprimer des activités fonctionnelles comparables à celles présentes chez l'animal entier. En outre, il est possible d'analyser de nombreux paramètres à partir de la suspension cellulaire initiale (BAUR et al.1975).

La cytotoxicité est habituellement appréciée par la mesure de la viabilité cellulaire au moyen du test classique de coloration au bleu Trypan et par la mesure de l'activité d'enzymes intra-cellulaires libérées dans le milieu d'incubation. La mesure de la lactico-déshydrogénase (LDH) apparaît être la plus représentative des enzymes relarguées dans le milieu afin de quantifier les dommages occasionnés à la membrane plasmique des hépatocytes traités par les substances à tester. Récemment, la mesure de l'activité de la LDH intra-cellulaire a été proposée comme index de cytotoxicité dans le modèle des hépatocytes de rat en culture primaire (CHAO et al.1988).

Pour certains auteurs, il est souhaitable de choisir des activités métaboliques de la cellule comme critère d'évaluation de la cytotoxicité. La mesure de la quantité d'albumine sécrétée atteste du bon fonctionnement des hépatocytes fraîchement isolés en suspension et en culture primaire (GUILLOUZO 1986).

Les hépatocytes fraîchement isolés ont été largement utilisés comme système d'évaluation d'une cytotoxicité des xénobiotiques (KLAASSEN et STACEY 1982, KRACK et al.1983). Généralement, les composés qui nécessitent une activation métabolique pour exercer leur effet, induisent une toxicité comparable à celle observée chez l'animal. TYSON et al.(1980) ont testé de nombreux composés et ont montré que seulement 2 d'entre eux donnaient des résultats différents de ceux décrits *in vivo*.

Les hépatocytes fraîchement isolés en suspension ont une durée de vie brève et ne peuvent donc être utilisés pour l'étude des effets chroniques ou à long terme des composés hépatotoxiques. De telles études peuvent s'envisager si l'on a recours à des cultures primaires (MacQUEEN et WILLIAMS 1982). Toutefois, il faut rappeler que les enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont légèrement altérées dans les cultures primaires. La baisse brutale du taux de cytochrome P 450 et de l'activité de plusieurs enzymes intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques après 1 à 2 jours de culture ne reflète plus ce qui se passe *in vivo* (GUGUEN-GUILLOUZO et GUILLOUZO 1983).

Ceci explique pourquoi les études de toxicité sur hépatocytes de rongeurs sont généralement limitées à 48 heures.

Il est possible de pallier cette diminution des caractéristiques fonctionnelles des hépatocytes et de la compenser par un choix judicieux d'un milieu de culture approprié, parfois "dopé" par l'ajout de cofacteurs. Le maintien correct des caractéristiques initiales des hépatocytes peut être prolongé par l'ajout de sérum de veau nouveau né ou foetal, d'insuline, d'hydrocortisone, de dexaméthasone, de glucagon ou d'acide aminolévulinique qui sont des précurseurs des voies de

biosynthèses de certaines fonctions essentielles (DICH et al. 1988). Le traitement des boîtes de Pétri par une solution de collagène afin de constituer une pellicule au fond des boîtes avant la mise en culture des hépatocytes, favorise l'attachement des cellules au support et stabilise les fonctions biochimiques (MICHALOPOULOS et PITOT 1975).

L'addition de diméthylsulfoxyde (DMSO) à 2% ou de phénobarbital pourrait également maintenir le taux correct de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (ISOM et al. 1985, MYAZAKI et al. 1985).

L'utilisation de co-cultures associant des hépatocytes à des cellules épithéliales semble représenter un système performant dans les études à long terme (supérieures à 10 jours) selon BEGUE et al. (1984), GUGUEN-GUILLOUZO et al. (1983).

Enfin, la possibilité de pouvoir disposer aujourd'hui d'hépatocytes humains en culture primaire représenterait la situation la plus favorable pour établir des comparaisons *in vivo/in vitro* qui soient les plus prédictives de la situation chez l'homme. Cependant, les "opportunités" qui permettent aux chercheurs d'avoir accès à des foies humains sains issus généralement de personnes accidentées ne trouvant pas de receveur greffable conservent un caractère assez exceptionnel.

En revanche, le développement récent de cultures primaires d'hépatocytes humains issus de biopsies prélevées chez des patients cancéreux est en cours de validation dans le Service de MPK du Centre SANOFI Recherches à Montpellier. SANOFI collabore avec les organismes publics (INSERM U 128 et U 278) pour l'optimisation de la technique d'obtention et de conservation des hépatocytes humains et sur la régulation des enzymes de phase I impliqués dans l'oxydation des principes actifs. Par ailleurs, une convention est signée entre le groupe SANOFI et l'INSERM pour la constitution d'une banque nationale d'hépatocytes humains cryocongelés (FABRE commun. personnelle).

Les avantages et les inconvénients des différents systèmes sont résumés dans le tableau I.

Tableau I : HEPATOCYTES ISOLES EN CULTURE - LES MODELES - LEURS POSSIBILITES ET LEURS LIMITES.

	HEPATOCYTES EN SUSPENSION	HEPATOCYTES EN CULTURE PRIMAIRE
Temps d'utilisation	quelques heures	24 à 48 heures, voire plusieurs jours avec des cofacteurs et plusieurs semaines en co-culture
Caractéristiques	très proches de la situation <i>in vivo</i> mais dommages de la membrane plasmique possibles dus à la préparation	très proches de la situation <i>in vivo</i> , les dommages de la membrane plasmique sont réparés après quelques heures de mise en culture
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - préparation facile, rapide - pas de contamination par des micro-organismes à craindre donc stérilité conseillée - mais non obligatoire - taux d'enzymes du système M.F.O. proches du <i>in vivo</i> (enzymes de phase I) - faible coût (<i>idem quam in vivo</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - très bonnes conditions physiologiques - réorganisation morphologique et structurale en mono-couche proche du tissu hépatique - reformation de contacts inter-cellulaires et de canalicules biliaires - bonne reproductibilité des résultats (<i>idem quam in vivo</i>)
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - temps d'utilisation réduit à quelques heures - reproductibilité des résultats sensibles à la qualité des préparations et du donneur (<i>idem quam in vivo</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - nécessite de disposer d'une infrastructure adaptée à la manipulation en conditions stériles (<i>idem quam in vivo</i>)

22. LES HEPATOTOXIQUES.

Les dysfonctionnements du foie provoqués par des produits chimiques ont été reconnus comme un problème toxicologique depuis environ 100 ans d'après ZIMMERMAN (1978).

Une revue très complète et bien documentée, classant les substances hépatotoxiques selon

- a) les altérations morphologiques et fonctionnelles
 - b) les altérations chimiques (nécrose, stéatose, cholestase intra-hépatique et hépatite virale)
 - c) sites cellulaires ou organites cibles
 - d) mécanismes d'action toxique (accumulation lipidique, synthèse protéique, peroxydation lipidique, nécrose, cholestase, cirrhose, carcinogénèse)
 - e) facteurs influant l'intoxication hépatique (biotransformation des toxiques, glutathion, altération du flux sanguin hépatique, potentialisation de l'hépatotoxicité)
- a été récemment établie par PLAA (1986).

Afin de construire des modèles permettant de cribler des substances susceptibles d'aider le foie à préserver son intégrité métabolique et fonctionnelle (substances hépatotropes), le toxicologue devra avant tout déterminer des conditions d'intoxication par des substances hépatotoxiques de référence. Il dispose pour cela d'un grand nombre de molécules pouvant produire une ou des perturbations dans la cellule hépatique (hépatocyte). La longue expérience acquise grâce aux expérimentations sur l'animal offre aux chercheurs un choix assez large de substances agressives. Les intoxications peuvent être modulées soit en fonction de la dose dans le cas des intoxications aiguës soit en fonction du temps dans le cas des intoxications répétées ou chroniques et entraînent respectivement une nécrose, une stéatose ou une cirrhose par exemple.

Dans les expériences *in vitro*, le modèle de culture des hépatocytes (en suspension ou en culture primaire) limite les possibilités offertes au chercheur. En effet, le choix du toxique de référence est imposé par le type de modèle de culture essentiellement à cause de la variable temps (voir tableau I). La survie brève des hépatocytes en suspension impose le choix d'un toxique ayant un mode d'action rapide alors que les hépatocytes en culture primaire donnent accès à une palette plus riche de substances toxiques de référence sans que le temps d'utilisation des cultures ne représente une réelle contrainte.

Ainsi, pour les expériences sur le modèle des hépatocytes en suspension, nous avons sélectionné le tétrachlorure de carbone (CCl₄) parmi les différents agents toxiques car il est facilement disponible et son action toxique *in vitro* est rapide comme nous allons l'exposer dans la suite. Son utilisation dans les expérimentations *in vivo* pratiquées depuis plusieurs années au laboratoire laissent présager de la possibilité d'établir ensuite des comparaisons *in vivo/in vitro*.

Pour les expériences sur les modèles d'hépatocytes en culture primaire, la D-galactosamine a été choisie comme substance toxique de référence, son mode d'action différent de celui du CCl₄ devant apporter des informations complémentaires.

221. LE TETRACHLORURE DE CARBONE.

Cette molécule appartient à la famille des agents toxiques directs qui par définition entraînent des lésions organiques avant d'entraîner des lésions métaboliques. Ils sont caractérisés par leur rapidité d'action et provoquent généralement une hépatite aiguë dont les lésions sont dose dépendantes (PLAA 1986).

Les hépatotoxiques directs sont rapidement éliminés par l'animal en cours d'expérimentation. On peut citer parmi ceux-ci le phosphore blanc, le chloroforme et surtout le tétrachlorure de carbone (CCl₄) qui sert classiquement de modèle expérimental pour reproduire, selon la dose, des lésions de type nécrose ou stéatose (PERRISSOUD 1981, PLAA 1986).

Différentes substances hépatotoxiques ont en commun la caractéristique de nécessiter une activation métabolique par un système enzymatique de telle sorte que le dérivé produit soit plus actif et serve de support à l'hépatotoxicité. Les toxiques appartenant à cette classe et fréquemment utilisés en pharmacologie sont le bromobenzène, la diméthylnitrosamine, l'alcool allylique, le tétrachlorure de carbone, le thioacétamide et le paracétamol. Le CCl₄ est certainement l'agent hépatotoxique le plus étudié et le plus utilisé pour évaluer l'effet protecteur de substances hépatotropes (LANS et al.1980, PERRISSOUD 1981).

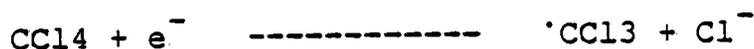
Les principales raisons pour lesquelles le CCl₄ a été très étudié reposent sur les faits qu'il est facile de se le procurer sous forme pure et qu'il produit des altérations du foie dans de nombreuses espèces dont la souris, le rat, le lapin et l'homme (SLATER 1984b).

Force est de constater que les mécanismes qui expliquent la toxicité du CCl₄ aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* sont nombreux et variés. La connaissance de ces mécanismes d'action est directement corrélable aux moyens mis en oeuvre pour appréhender les voies métaboliques incriminées.

Une monographie des conséquences générales du CCl₄ sur les voies métaboliques ainsi qu'une revue importante sur la biotransformation des hydrocarbures halogénés a été décrite par ANDERS (1984). Cependant, la lipoperoxydation représente le phénomène majeur de l'impact du CCl₄ sur le foie. Depuis environ 50 ans de très nombreux chercheurs se sont penchés sur l'étude de ce toxique et certains articles de synthèse constituent des références de base très documentées (RECKNAGEL et GHOSHAL 1966, RECKNAGEL 1967, RECKNAGEL et GLENDE 1973, RECKNAGEL et al.1977, SLATER 1978, SLATER 1982, BRIDGES et al.1983, RECKNAGEL 1983, SLATER 1984a, BACON et al.1986, PLAA 1986).

Les principes de la lipoperoxydation :

Le CCl₄ est métabolisé par réduction électronique catalysée spécifiquement par le cytochrome P 450 (NOGUCHI et al.1982). La réaction produit un radical trichlorométhyl ([•]CCl₃)



En présence d'oxygène moléculaire, la plupart des radicaux [•]CCl₃ réagissent pour former le radical libre trichlorométhylperoxy ([•]OCCl₃) (PACKER et al.1978). Ce radical beaucoup plus réactif que le ([•]CCl₃) est responsable de l'attaque d'un groupement méthylène situé entre deux doubles liaisons dans une chaîne aliphatique d'un acide gras polyinsaturé. Des acides gras polyinsaturés entrent dans la composition des phospholipides membranaires et ainsi s'initie le processus de lipoperoxydation (SLATER 1984a). Il en découle une suite de réactions chimiques complexes qui mènent à la décomposition des acides gras polyinsaturés (PORTER 1984, SLATER 1984b).

Le processus se déroule en 3 phases :

- phase d'initiation

Les molécules d'acide gras polyinsaturés (AGPI) sont attaquées préférentiellement par le radicaux libres au niveau des atomes d'hydrogène de groupements méthylènes (CH₂) situés entre deux doubles liaisons C=C.

- phase de propagation

Après l'attaque de l'AGPI par le radical libre ([•]CCl₃) il se forme immédiatement un radical libre lipidique ([•]L) avec déplacement d'un électron du radical libre par résonnance. Celui-ci réagit très rapidement avec l'oxygène moléculaire pour former un radical libre lipoperoxy ([•]OOL).

Au niveau des lipoprotéines de la membrane cellulaire, les chaînes d'acide gras qui constituent les phospholipides sont très étroitement juxtaposés. Ainsi, un radical libre lipoperoxy situé sur une chaîne d'un acide gras phospholipidique réagit en arrachant un hydrogène du méthylène de l'acide gras polyinsaturé voisin, à l'origine d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) et d'un nouveau radical libre lipidique ([•]L). Ce phénomène autocatalytique peut se propager théoriquement de proche en proche.



- phase terminale

Elle correspond à l'inactivation des radicaux libres pour aboutir à la production d'une molécule stable qui peut être obtenue de plusieurs façon (PRYOR 1976)

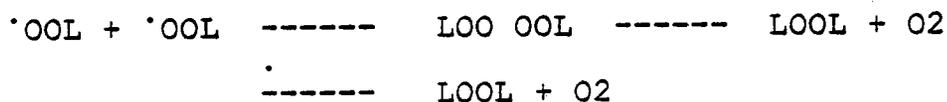
1) Combinaison de 2 radicaux libres lipidiques



2) Combinaison d'un radical libre lipoperoxy avec un radical libre lipidique



3) Combinaison de 2 radicaux libres lipoperoxy



La progression de la lipoperoxydation induite par le CCl₄ *in vivo* aboutit à la formation de malonaldehyde, d'alcane volatiles tels que l'éthane et le pentane, divers aldehydes et cétones (ESTERBAUER 1982).

Comme évoqué précédemment, la détermination des mécanismes biochimiques occurants dans l'intoxication par le CCl₄ ne s'est développée qu'au fur et à mesure des progrès techniques analytiques, même si les principes sont parfois anciens.

Les mitochondries ont été les premiers organites cellulaires à être étudiés. CHRISTIE et JUDAH (1954) montrèrent que le CCl₄ altérait la perméabilité membranaire des mitochondries avec diminution de l'activité de plusieurs enzymes du cycle de Krebs. Pour des raisons de cinétique, les changements intervenant dans le métabolisme des mitochondries ont pu être rapidement dissociés de l'accumulation des lipides dans le foie (RECKNAGEL 1967, JUDAH 1969).

Par des dosages de la glucose-6-phosphatase, enzyme associée aux membranes du réticulum endoplasmique, cette seconde cible du CCl₄ a été mise en évidence très tôt (RECKNAGEL et LOMBARDI 1961). L'altération de la structure lipidique des microsomes par un phénomène peroxydatif est un phénomène précoce dans les effets du CCl₄ sur le réticulum endoplasmique (RECKNAGEL et GHOSHAL 1966).

Indépendamment du phénomène de lipoperoxydation, la pompe à calcium du réticulum endoplasmique est perturbée très rapidement après l'administration du CCl₄ aux animaux (MOORE 1980, WALLER et al.1983) et pourrait être la cause de la mort des cellules hépatiques (YOUNES et al.1983).

Il n'existe pas encore de consensus quant à la nature exacte des mécanismes précoces qui se déroulent dans l'intoxication du foie par le CCl₄ (PENCIL et al.1984). De nombreux points demeurent encore obscurs (LAMB et al.1984, REYNOLDS et al.1984).

Si la peroxydation lipidique semble bien représenter une des atteintes majeures qui se manifeste par l'action de l'oxygène moléculaire sur les acides gras polyinsaturés lorsque le CCl₄ sert à intoxiquer des animaux *in vivo*, des publications récentes indiquent que ce phénomène est sujet à controverses d'un point de vue chronologique dans l'intoxication des hépatocytes *in vitro* (YOUNES et SIEGERS 1984, BERGER et al.1986).

KIM et LABELLA (1987) décrivent des résultats qui supportent l'hypothèse de l'implication de la peroxydation lipidique comme responsable de l'hépatotoxicité induite par le CCl₄ chez la souris.

Depuis une décennie, l'utilisation de modèles *in vitro* tels que les fractions hépatiques microsomales et surtout les hépatocytes isolés de rongeurs, a permis de réaliser des progrès considérables dans la compréhension des mécanismes biochimiques et structuraux en toxicologie. Le tétrachlorure de carbone a suscité pour les chercheurs un intérêt tout particulier et a fait l'objet d'un grand nombre de travaux dont nous décrivons maintenant les points principaux obtenus avec des modèles d'hépatocytes de rat en suspension.

Lipoperoxydation induite par le CCl₄ sur les hépatocytes *in vitro*

Si la peroxydation lipidique semble représenter la pathogénie majeure incriminée dans l'intoxication hépatique par le CCl₄ *in vivo* (RECKNAGEL et GLENDE 1973), les études *in vitro* sur les hépatocytes isolés révèlent l'existence d'une relative discordance quant à sa mise en évidence et surtout quant à sa causalité de l'altération cellulaire.

Les auteurs ont utilisé des concentrations de CCl₄ très diverses et des protocoles si variables que les comparaisons sont assez délicates.

Différentes méthodes ont permis de quantifier la lipoperoxydation. Le dosage de la malonaldéhyde (MDA) par la réaction avec l'acide thiobarbiturique est certainement le dosage colorimétrique le plus employé car d'une grande simplicité à réaliser mais assez peu spécifique. Une étude comparative de 5 techniques de détection de la lipoperoxydation montre que la mesure de la production d'éthane est la méthode la plus sensible (SMITH et al.1982).

Par le dosage de la malonaldéhyde formée, WEDDLE et al. (1976) font pour la première fois la démonstration que le CCl₄ provoque une lipoperoxydation dans les hépatocytes isolés. Le CCl₄ est ajouté directement dans le milieu de culture des hépatocytes afin de donner une concentration finale de 10 µl/ml (100 mM) et la mesure de la MDA formée est effectuée après 30

minutes d'incubation. L'augmentation de MDA n'a été détectée que dans le cas où les rats étaient à jeun ou prétraités au phénobarbital c'est à dire après induction du cytochrome P-450, les cellules étaient alors toutes perméables au bleu Trypan.

LINDSTROM et al. (1978) obtiennent une légère augmentation de la MDA après 90 minutes de traitement des hépatocytes par le CCl₄ 0,5 ul/ml dissout directement dans le milieu de culture avec des rats nourris mais seulement lorsque les animaux sont prétraités par le phénobarbital ou le diéthylmaléate i.e. lorsque le cytochrome P-450 est stimulé ou les anti-oxydants neutralisés. Ce n'est que lorsque les rats sont prétraités par les 2 produits que la production de MDA est augmentée pour des concentrations en CCl₄ supérieures à 0,25 ul/ml ceci s'accompagne alors d'une augmentation du relargage de LDH.

POLI et al. (1978) exposent 3 ml de suspension d'hépatocytes aux vapeurs de 2,5 ul de CCl₄ (soit 0,8 ul/ml) placés dans le puit central d'un récipient clos et maintenu à l'obscurité. Après 60 minutes de traitement, la MDA formée augmente et cette augmentation de MDA induite par le CCl₄ est partiellement inhibée par le SKF 525-A (- 40 % pour les doses supérieures à 10 uM) et inhibée selon une relation de dose par le propylgallate ou la (+)catéchine. L'inhibition est totale en présence de prométhazine. Aucune donnée n'est fournie sur la viabilité des hépatocytes traités.

GRAVELA et al. (1979) dans une étude complémentaire, augmentent à 7,5 ul/fiole (2,5 ul/ml) la quantité de CCl₄ ajoutée dans le puit, raccourcissent le temps de traitement à 40 minutes et utilisent un milieu simplifié. Dans ces conditions, une augmentation de la MDA est mesurée (2,5 fois la valeur du lot témoin), la fuite de LDH n'est pas modifiée, la sécrétion de protéines baisse de 52 % et la sécrétion de lipides chute de 81 %. Le SKF 525-A et la prométhazine inhibent l'augmentation de MDA induite par le CCl₄ mais sont sans effet sur les autres paramètres. Ces phénomènes seraient donc dissociés et suggèrent que le CCl₄ agit selon plusieurs mécanismes *in vitro*.

POLI et al. (1979) reproduisent les conditions d'expérience de WEDDLE et al. (1976) et déterminent qu'en ajoutant directement 1 à 2 ul de CCl₄/ml de milieu d'incubation, il n'y a pas seulement une prise dramatique du bleu Trypan par les hépatocytes mais encore un relargage important des enzymes LDH, GPT et GOT. Par la mesure du CCl₄ marqué au ¹⁴C, lorsque le toxique agit sur les cellules par simple diffusion dans le milieu, la concentration mesurée réellement présente est de 20 ng/ml et reste stable durant les 60 minutes de traitement.

En augmentant légèrement le temps d'incubation à 60 minutes au lieu de 40 minutes, la dose de 7,5 ul/fiole est sans effet sur la viabilité cellulaire et sur la fuite des enzymes LDH, GPT ou GOT, en revanche la MDA formée augmente et atteint une valeur plateau à patir de cette dose de CCl₄. Des doses supérieures de CCl₄ n'augmentent pas davantage la production de

MDA mais augmentent la prise du bleu Trypan ainsi que la fuite des enzymes. Il faut remarquer que l'augmentation de MDA n'a pas pu être obtenue avec un milieu complet tel que le Ham F 12 avec sérum de veau probablement parce que le CCl₄ interfère avec les protéines ajoutées au milieu comme l'a montré PERRISSOUD (1981).

POLI et al. (1981) observent que des hépatocytes ayant un contenu faible en glutathion produisent plus de MDA que des hépatocytes ayant un fort taux de glutathion lorsqu'ils sont traités par le CCl₄ à la dose de 7,5 ul/fiole (129 uM). Il en va de même pour la diminution de l'activité de la glucose-6-phosphatase alors qu'il n'est pas observé de différence sur l'inhibition du cytochrome P-450. Le glutathion a bien un rôle inhibiteur de la cytotoxicité du CCl₄ *in vitro*.

POLI et al. (1983) comparent l'action toxique du CCl₄ à celle de l'ion ferrique (dans le complexe ADP/Fe³⁺) par la mesure de la lipoperoxydation. Une faible augmentation de la production de MDA est mesurée après 60 minutes de traitement par 129 uM de CCl₄. Cette faible concentration de toxique entraîne un léger relargage de LDH et ne modifie pas la prise du bleu Trypan alors qu'elle diminue sensiblement l'activité de la glucose-6-phosphatase. L'action du complexe ADP/Fe³⁺ sur la production de MDA est beaucoup plus marquée que pour le CCl₄.

STACEY et al. (1982) ajoutent le CCl₄ directement dans le milieu d'incubation des hépatocytes à des doses de 1 à 5 ul/4 ml, les fioles sont hermétiquement fermées et incubés durant 120 minutes sans agitation. La lipoperoxydation est détectée par la mesure de l'éthane produit ou bien par la mesure de la MDA formée. Les résultats montrent que le milieu EMEM est plus favorable à l'induction de la lipoperoxydation qu'une simple solution saline telle que le tampon TRIS avec sels de Hanks. La production d'éthane est diminuée voir totalement inhibée lorsque les hépatocytes sont incubés sous carbogène 95 % O₂/ 5 % CO₂, les résultats sont moins nets avec la mesure de MDA. Le relargage de la LDH n'est augmenté significativement que dans le cas où les hépatocytes sont incubés en présence d'air avec 5 ul de CCl₄/flask et les valeurs sont plus élevées avec le EMEM qu'avec le TRIS. IL est intéressant de noter que l'ajout direct du CCl₄ dans le milieu de culture des hépatocytes est préféré à la simple diffusion du toxique via sa phase vapeur alors qu'il avait été expliqué par ces mêmes auteurs que cette méthode donnait des résultats moins reproductibles et que des doses de CCl₄ très élevées (60 à 100 ul) étaient alors nécessaires pour obtenir une réponse toxique (STACEY et PRIESTLY 1978). L'approche utilisée par ces auteurs pour incuber les hépatocytes en suspension dans des fioles en absence d'agitation peut constituer un maillon de transition entre les hépatocytes en suspension et les hépatocytes en culture primaire .

BERGER et al. (1986) traitent des hépatocytes isolés de rat en suspension dans des boîtes de Pétri maintenues en agitation sous carbogène 95 % O₂/ 5 % CO₂. La solution mère de CCl₄ est solubilisée à raison de 20 % dans l'éthanol afin

d'obtenir des doses de CCl₄ comprises entre 0,5 et 4 ul/ml de suspension, ce qui implique que les proportions de solvant doivent être variables entre les lots traités. Les auteurs montrent qu'au moins 2 mécanismes peuvent être impliqués dans l'intoxication des hépatocytes par le CCl₄. Une première phase précoce se produit dès les premières minutes de contact avec le CCl₄ et se caractérise par une petite production de MDA sans diminution du taux de glutathion réduit intracellulaire. Durant cette phase ni le SKF 525-A ni la métyrapone ni la prométhazine ne sont protecteurs. Une deuxième phase se manifeste après 3 heures de contact avec le CCl₄ et elle se caractérise par une augmentation importante de la MDA formée avec diminution du taux de glutathion réduit intracellulaire. Les effets sont modérés par les inhibiteurs du cytochrome P-450, la prométhazine et les anti-oxydants. Le relargage de GOT est corrélé au test d'exclusion du bleu Trypan ainsi qu'à la mesure du K⁺ intracellulaire, il augmente rapidement (dès 30 minutes) surtout avec la plus forte dose de CCl₄ (4 ul/ml soit 40 mM) qui représente une dose de toxique très élevée. Pour les doses de CCl₄ inférieures, l'évolution se déroule selon 2 cinétiques, l'une rapide à pente forte entre le début de traitement et le temps 30 minutes, l'autre plus lente à pente faible progresse jusqu'au temps 5 heures. Les auteurs concluent que le CCl₄ produit d'abord une toxicité partiellement réversible par "effet solvant direct" sur les hépatocytes puis une toxicité tardive irréversible due à la lipoperoxydation. Ces assertions s'opposent aux conclusions de PERRISSOUD et TESTA (1986) qui par la comparaison des effets de 3 halogénométhane (CCl₄, CBrCl₃, CHCl₃) en déduisent que la cytotoxicité du CCl₄ ne peut s'expliquer par un effet de solubilisation de la membrane des hépatocytes puisque le CCl₄ et le CBrCl₃ sont équitoxiques et que le CHCl₃ est atoxique sur les hépatocytes.

En complément de ces informations, il faut citer les travaux de KRACK et al. (1985) qui, en ajoutant le CCl₄ directement dans le milieu d'incubation des hépatocytes, montrent que la concentration de 10 mM de CCl₄ induit une lyse des cellules et un relargage important de LDH dès la première heure de traitement.

Alors que la majorité des auteurs précités utilisent des concentrations assez élevées de CCl₄ pour induire des dommages cellulaires, 2 auteurs ont pu obtenir des relargages d'enzymes intracellulaires avec de faibles concentrations de ce toxique solubilisé dans le DMSO.

PERRISSOUD (1981) ajoute le CCl₄ solubilisé dans le DMSO sous un volume de 60 ul pour 1,6 ml de suspension d'hépatocytes de rat soit 3,6 % (v/v). Les cellules sont traitées par le CCl₄ 2 mM durant 20 minutes et le milieu d'incubation est un tampon Krebs Ringer Bicarbonate Glucose sans sérum albumine bovine. Un relargage moyen de GOT de 31,3 % + 7,2 est obtenu avec 20 préparations d'hépatocytes issues de rats différents.

AGUIAR (1985) ajoute le CCl₄ solubilisé dans le DMSO sous

un volume de 20 μ l pour 2 ml de suspension d'hépatocytes de rat soit 1 % (v/v). Les cellules sont traitées durant 120 minutes par le CCl₄ à des doses de 1, 2 et 8 mM. Le milieu d'incubation est un tampon Krebs Ringer Bicarbonate Glucose avec 0,5 % de sérum albumine bovine (p/v). Seule la dose de 8 mM augmente nettement le relargage de GOT dès le temps 30 minutes, les doses inférieures ont un effet très faible sur cette enzyme. En revanche, un effet dose est observé pour le relargage de LDH, une fuite très faible est mesurée avec 1 mM de CCl₄ mais elle est plus importante avec 2 mM de CCl₄ (augmentation linéaire durant 120 minutes) et très marqué pour 8 mM de CCl₄ après le temps 30 minutes.

D'après les indications fournies par la littérature, il paraît difficile de déterminer avec certitude si la lipoperoxydation intervient de façon prépondérante dans l'intoxication des hépatocytes en suspension par le CCl₄ ou bien si c'est un effet "solvant" du CCl₄ sur les membranes qui est en fait responsable de la mort des hépatocytes.

Lorsque les hépatocytes sont traités par des faibles concentrations de CCl₄ le doute est encore plus profond.

En outre, les altérations de nombreux autres paramètres biochimiques ont été mises en évidence à la suite de l'intoxication des hépatocytes *in vitro* par le CCl₄. Par exemple, on peut citer une altération rapide de l'homéostasie du calcium (PENCIL et al.1982); une inhibition de la synthèse protéique (CI 50 du CCl₄ située à 400 μ M) sans que la présence de calcium extracellulaire ne soit requise (HEGARTY et al.1984); une inhibition de la sécrétion des VLDL (CI 50 du CCl₄ située à 80 μ M) indépendante de la concentration en calcium extracellulaire (PENCIL et al.1984a, 1984b).

L'amélioration des techniques de culture des hépatocytes *in vitro* ayant fait des progrès considérables ces dernières années, les cultures primaires d'hépatocytes ont pu servir de modèles logistiques dans un grand nombre de travaux sur la cytotoxicité du CCl₄. On rencontre les mêmes polémiques que celles précédemment décrites pour les hépatocytes de rat en suspension pour lesquelles nous avons tenté de brosser un tableau représentatif des tendances bien que non exhaustif.

La concentration en calcium extracellulaire jouerait un rôle important dans la cytotoxicité du CCl₄. Une concentration en calcium extracellulaire inférieure à 0,1 mM n'est pas suffisante pour que la mort des hépatocytes induite par le CCl₄ puisse se produire. Si la concentration en calcium extracellulaire est comprise entre 0,3 et 3,6 mM, l'action toxique du CCl₄ est augmentée. Le prétraitement des rats par le phénobarbital rend les hépatocytes plus sensibles au CCl₄ que lorsque les cellules proviennent de rats non induits. La présence de calcium

extracellulaire transformerait une cytotoxicité au préalable sub létale en dommages irréversibles entraînant la mort des hépatocytes traités par le CCl₄. Pour ces expériences, les doses de CCl₄ sont de 0,25 à 0,35 µl/ml de milieu, le toxique est solubilisé dans l'éthanol et les temps de traitements vont de 3 à 8 heures (CASINI et FARBER 1981).

CHENERY et al. (1981) montrent que le calcium extracellulaire n'intervient sur la toxicité du CCl₄ que lorsque le toxique est utilisé à faibles doses (1,6 mM) mais que lors de traitements par des doses de CCl₄ plus élevées, aucune potentialisation du relargage d'enzymes intracellulaires n'est attribuable à la présence de calcium dans le milieu de culture des hépatocytes.

Des changements dans la dynamique du calcium intracellulaire consécutifs à l'adjonction de CCl₄ à des hépatocytes de rat postnatal en culture primaire constitueraient un aspect important des conséquences pathologiques de l'hépatotoxicité induite par le CCl₄ *in vitro* (STANTONE et al. 1988).

Enfin, dans des expériences menées sur la toxicité du CCl₄ dans un même laboratoire, une comparaison sur l'action de ce toxique a été établie *in vivo* et *in vitro*. Des concentrations de CCl₄ comparables sont mesurées dans le sang des animaux traités (0,3 mM après 30 minutes) et dans le milieu de culture des hépatocytes (0,49 mM après 5 minutes). Les auteurs observent une inhibition de la pompe à calcium du réticulum endoplasmique en même temps qu'une stimulation de l'activité de la phosphorylase-a (après 30 minutes *in vivo* et 5 minutes *in vitro*), une inhibition de la glucose-6-phosphatase (après 120 minutes *in vivo* et après 20 minutes *in vitro*), aucune influence sur la 5'nucléotidase, la libération de GPT, la déplétion en glycogène (maximal après 8 heures *in vivo* et après 30 minutes *in vitro*), augmentation du calcium total après 24 heures *in vivo* mais pas de variation *in vitro* (ceci serait dû à une déficience des mitochondries à stocker le calcium). Ces résultats amènent les auteurs à conclure que les modifications biochimiques induites par le CCl₄ sont comparables *in vivo* et *in vitro* mais que la progression dans les altérations cellulaires est beaucoup plus rapide *in vitro* *quam in vivo* (LONG et MOORE 1988).

Etude des altérations morphologiques induites par le CCl₄ *in vitro* dans le modèle des hépatocytes de rat en suspension

Les effets du CCl₄ sur la cytomorphologie des hépatocytes isolés de rat en suspension ont été examinés sur des préparations de microscopie électronique par 4 groupes de chercheurs utilisant

des protocoles différents pour traiter les hépatocytes.

STACEY et FANNING (1981) exposent 2 ml de suspension d'hépatocytes aux vapeurs de 15 μ l de CCl₄ introduits dans le bras d'un erlenmeyer de 25 ml leur permettant d'obtenir une concentration de 14 mM de CCl₄ dans le milieu. Une altération rapide (5 minutes) des microvillosités de la surface des cellules est suivie de la formation de bulles après 10 minutes de traitement. Au bout de 15 minutes, le réticulum endoplasmique granuleux est touché ainsi que les mitochondries et la chromatine du noyau. Si certaines altérations sont similaires à celles observées *in vivo*, d'autres sont différentes, de telle sorte que le mécanisme de l'altération des hépatocytes par le CCl₄ pourrait ne pas être identique *in vivo* et *in vitro*.

TYSON et al. (1983) exposent 4 ml de suspension d'hépatocytes aux vapeurs de 6 ou 9 μ l de CCl₄ placés dans un puit au centre d'un erlenmeyer de 25 ml et obtiennent des concentrations de 1,2 et 1,8 mM de CCl₄ dans le milieu. Comme STACEY et FANNING (1981), des altérations des microvillosités de surface et du réticulum endoplasmique sont observées pour les 2 doses ainsi qu'une altération importante des mitochondries mais seulement pour la concentration de CCl₄ la plus élevée.

Pour ces 2 études, l'utilisation d'un tiers solvant n'a pas été requise.

A partir d'une solution mère de CCl₄ solubilisé dans le DMSO (54 μ l pour 10 ml de DMSO), PERRISSOUD et al. (1981) ajoutent le CCl₄ sous un volume de 60 μ l pour 1,6 ml de suspension d'hépatocytes soit 3,6 % (v/v), ils obtiennent ainsi 0,2 μ l de CCl₄/ml de suspension (2 mM). Dans ces conditions expérimentales, une disparition des microvillosités de la membrane plasmique des hépatocytes avec apparition de bulles s'observe dès les 5 premières minutes de traitement. Le réticulum endoplasmique gonfle et se fragmente en petites vésicules après 10 minutes de traitement puis les mitochondries enflent et une désorganisation des crêtes mitochondriales accompagnée d'une dégranulation du réticulum endoplasmique apparaît au bout de 20 minutes de traitement.

BERGER et al. (1987) ensemencent des boîtes de Pétri avec 4 ml de suspension d'hépatocytes de rat et ajoutent le CCl₄ mis en solution dans l'éthanol à 20 % (solution mère de CCl₄) afin d'obtenir des concentrations de CCl₄ de 10 à 20 mM en début d'expérience. Les cellules sont en fait soumises à des concentrations de toxique qui décroissent durant l'essai à cause de l'évaporation du solvant (BERGER et al. 1986). En moins de 2 minutes, la membrane plasmique des hépatocytes est altérée et les microvillosités gonflent puis forment rapidement des bulles qui fusionnent entre elles (après 10 à 30 minutes de traitement). Une dispersion et désagrégation du réticulum endoplasmique rugueux accompagnée d'une redistribution du réticulum endoplasmique se manifestent concomitamment à la formation des bulles. Ces altérations sont plus marquées lorsque les hépatocytes sont traités à la dose de 2 μ l/ml (20 mM) qu'à la dose de 1 μ l/ml.

Aucune altération cytomorphologique n'est observée avec des concentrations en CCl₄ inférieures à 1 ul/ml (10 mM)! L'effet du CCl₄ sur les hépatocytes de rat serait réversible pour les doses de CCl₄ sublétales et un retour à une cytomorphologie normale de la membrane plasmique est possible. Les auteurs concluent qu'il est envisageable d'expliquer ces phénomènes en soutenant l'hypothèse qu'un effet solvant direct serait responsable de la cytotoxicité précoce du CCl₄ sur les hépatocytes de rat en suspension (BERGER et SOZERI 1987).

D'après ces éléments, il apparaît clairement que le tétrachlorure de carbone agit très rapidement sur les hépatocytes de rat en suspension et qu'il altère successivement la membrane plasmique puis le réticulum endoplasmique avant de toucher les mitochondries et le noyau.

222. LA D-GALACTOSAMINE.

Cette molécule appartient à la famille des agents toxiques indirects qui se caractérisent par le fait que les lésions organiques sont la suite de dérèglements métaboliques. Les agents toxiques indirects manifestent leur effet toxique en bloquant ou en interférant sur une voie métabolique du foie et en engendrant une déplétion ou une accumulation d'un métabolite ou d'un coenzyme essentiel. L'action est généralement lente et les perturbations biochimiques induites nécessitent un traitement prolongé pour pouvoir être détectées. On peut citer parmi ces substances : la D-galactosamine et l'éthanol qui sont les plus employées comme modèles pharmacologiques (PERRISSOUD 1981).

La D-galactosamine *in vivo* :

La D-galactosamine est un agent hépatotoxique utilisé *in vivo* pour induire une hépatite expérimentale chez l'animal proche de l'hépatite virale chez l'homme. KEPPLER et al. (1968) ont décrit pour la première fois cette altération chez le rat et ils ont remarqué des analogies entre les lésions provoquées par la D-galactosamine et celles provoquées par les virus de l'hépatite chez l'homme.

La ressemblance entre la nécrose hépatique provoquée par la D-galactosamine et celle provoquée par les virus de l'hépatite a suscité certains travaux *in vivo* pour connaître les mécanismes d'action de ce toxique dont nous donnerons les principales caractéristiques avant de décrire quelques aspects de son utilisation *in vitro* sur les hépatocytes isolés.

Les effets de la D-galactosamine, D-glucosamine et du 2-désoxy-D-galactose sur les uraciles nucléotides du foie de rat ont été étudiés *in vivo*. L'injection de D-galactosamine (400 mg/kg en I.P.) entraîne une accumulation des dérivés sucrés uridine 5' diphosphates avec épuisement des uridines phosphates endogènes et des UDP hexoses ainsi qu'une augmentation des

uraciles nucléotides hépatiques totaux (KEPPLER et al.1970, DECKER et KEPPLER 1972, 1974 pour revue).

Les premières étapes du métabolisme de la D-galactosamine empruntent la voie biochimique du métabolisme du galactose et conduisent à la formation d'UDP-galactosamine et d'UDP-glucosamine qui ne se trouvent pas dans le foie sain.

Alors que les métabolites de la D-galactosamine sont des constituants normaux du foie qui entrent dans la composition des glycoprotéines de structure, l'administration d'une forte dose de D-galactosamine entraîne la formation de galactosamine 1-phosphate dans le foie et provoque une accumulation des dérivés UDP-galactosamine avec déplétion en UTP, UDP-hexoses et diminution de la capacité de synthèse de macromolécules par carence en uraciles nucléotides (LEHNINGER 1981).

L'altération de la synthèse de RNA et des glycoconjugués semble constituer un facteur prépondérant dans le développement de l'intoxication cellulaire consécutive à une déficience en UTP qui agit comme substrat des RNA-polymérasés (KEPPLER et al.1974).

Les étapes essentielles du métabolisme de la D-galactosamine sont présentées sous forme d'un schéma dans la figure 1.

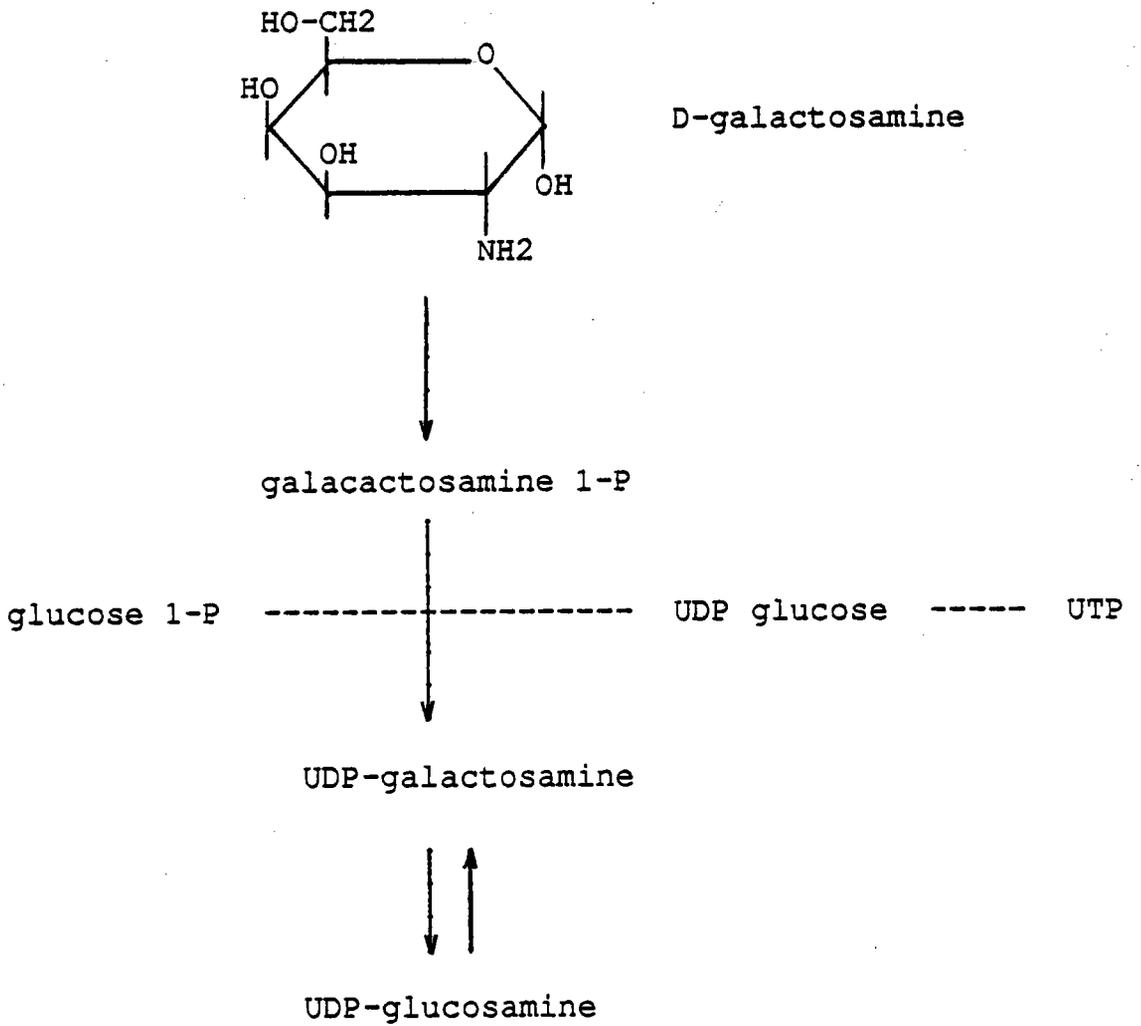


Figure 1 : METABOLISME DE LA D-GALACTOSAMINE
(d'après PERRISSOUD 1981)

Des études morphologiques montrent que la D-galactosamine agit sur l'ensemble des hépatocytes à des degrés variables selon la dose et que les signes de l'intoxication révèlent une désorganisation de la structure nucléolaire suivie par une dilatation du réticulum endoplasmique et altération de la membrane plasmique ce qui se traduit biochimiquement par des relargages d'enzymes intracellulaires telles que la LDH ou la GPT (MEDLINE et al.1970, SHINOZUKA et al.1973a,1973b).

Une dose de 200 mg/kg injectée en I.P. produit une inhibition de la synthèse de RNA et des protéines sans entraîner la mort des cellules hépatiques alors qu'après 24 heures de traitement par une dose de D-galactosamine de 400 mg/kg en I.P. la mort des cellules hépatiques vient se surajouter aux phénomènes précités. Une réduction de 40 % de l'activité de la 5' nucléotidase de la membrane plasmique associée à une perturbation du contenu cellulaire en ions calcium pourraient être les responsables de la mort cellulaire. Ces altérations peuvent être enrayerées par l'administration simultanée d'uridine (EL-MOFTY et al.1975).

La D-galactosamine in vitro :

Les études qui décrivent les effets de la D-galactosamine sur les hépatocytes isolés de rat confirment généralement les observations établies *in vivo*.

Les cellules de Kuppfer n'interviennent pas dans la capture d'uridilate impliquée dans le processus d'intoxication du foie par la D-galactosamine (HOFMANN et al.1976a). La D-galactosamine entraîne rapidement une décroissance du contenu en UTP et UDPG selon la dose (0,2 à 4 mM) sans modifier le contenu en ATP ni le relargage de GPT (HOFMANN et al.1976b).

La D-galactosamine 10 mM diminue la biosynthèse des protéines, la sécrétion de triglycérides et la libération de glucose après 2 heures d'incubation (PERRISSOUD 1981).

La D-galactosamine 2 mM ne perturbe pas la formation de glucose à partir du glycogène mais diminue le contenu intracellulaire de phosphate inorganique ainsi que le contenu en ATP en moins de 20 minutes, elle inhibe en même temps la glycogénolyse (-55 %) et la production de glucose (-45 %) (STERMANN et al.1978).

Après injection de D-galactosamine (600 mg/kg en I.P.) les hépatocytes des rats traités sont isolés (expériences dites *ex vivo*). L'oxydation du palmitate et non celle de l'octanoate est nettement diminuée dans les hépatocytes des rats traités, l'oxydation du palmitoyl-CoA et non du palmitoyl L-carnitine est altérée dans les mitochondries isolées de telle sorte que la D-galactosamine perturbe le taux d'oxydation des acides gras hépatiques en modifiant le niveau de l'enzyme carnitine-palmitoyl transférase I (MANGENEY-ANDREANI et al.1982). La D-galactosamine 10 mM augmente la synthèse de triacylglycérol en inhibant la voie d'oxydation du palmitate et diminue la sécrétion de triacylglycérol en perturbant très rapidement la voie de sécrétion (MANGENEY et al.1985).

L'éthanol 40 mM potentialise l'inhibition de la synthèse protéique lorsque les hépatocytes sont traités par 2,5 mM de

D-galactosamine durant 2 heures alors que chaque produit ajouté séparément aux cellules est peu ou pas actif (MANDL et al.1983).

La D-galactosamine est moins efficace que la galactosone pour inhiber la glucuronidation intracellulaire des hépatocytes isolés lors d'expériences à court terme (10 à 20 minutes) (ULLRICH et BOCK 1984).

Dans les modèles d'hépatocytes de rat en suspension, l'altération de la membrane plasmique détectée par la mesure des fuites d'enzymes intracellulaires n'a pu être obtenue lorsque les hépatocytes sont traités par des doses de D-galactosamine comprises entre 0,2 et 4 mM (HOFMAN et al.1976b). Une très faible augmentation d'ASAT est mesurée lorsque les hépatocytes sont traités avec des doses très élevées de D-galactosamine (50 à 100 mM) pendant 60 minutes (MANGENEY et al.1985). PERRISSOUD (1981) a observé une diminution de la fuite d'ASAT et de LDH lorsqu'il a traité des hépatocytes de rat en suspension pendant 6 heures avec de la D-galactosamine 10 mM.

Grâce à l'utilisation de modèles d'hépatocytes de rat en culture primaire, l'influence de la concentration extracellulaire en ions calcium (présents dans le milieu d'incubation des hépatocytes) sur la toxicité de la D-galactosamine a montré que la mort des hépatocytes peut être provoquée par une dose de 0,5 mM lors d'un temps de traitement de 36 heures. Le milieu d'incubation est le milieu de Williams additionné de 10 % de sérum de veau foetal inactivé. La mesure de la viabilité résiduelle par le test au bleu Trypan montre que la D-galactosamine à la dose de 0,5 mM entraîne une diminution progressive du nombre de cellules vivantes avec détachement des hépatocytes de leur support. La mort cellulaire est totalement entravée par l'addition d'uridine à la concentration de 3 mM et partiellement réduite par la chlorpromazine à la concentration de 1,4 mM. L'altération de l'homéostasie du calcium intracellulaire serait une des causes majeures de la mort des hépatocytes (SCHANNE et al.1980).

Ces résultats ont pu être reproduits en utilisant du milieu EMEM additionné de 10 % de sérum de veau inactivé et ils ont été complétés par la mesure de la fuite de l'enzyme intracellulaire GPT . L'addition d'insuline 10^{-8} M et de dexaméthasone 10^{-6} M (cofacteurs souvent ajoutés dans les milieux de culture pour maintenir le taux de cytochrome P-450 et les capacités fonctionnelles des hépatocytes en culture primaire) ne modifie pas l'atteinte des hépatocytes par la D-galactosamine 0,5 mM (KISO et al.1983b).

La cytotoxicité de la D-galactosamine sur les hépatocytes de rat en culture primaire a été récemment évaluée de façon exhaustive par l'équipe de DECKER. Dans les expériences décrites, l'intoxication des hépatocytes de rat est provoquée par 4 mM de D-galactosamine en traitant les cellules durant 18 heures en milieu de Waymouth additionné de 5 % de sérum de veau foetal, le milieu est ensuite remplacé par du milieu frais sans D-galactosamine et les hépatocytes sont maintenus en culture pendant plusieurs jours. Les cellules sont traitées après 3 heures d'incubation à 37 degrés (temps laissé aux hépatocytes

pour s'attacher sur des boîtes de Pétri recouvertes d'un film de collagène). Les dommages cellulaires observés *in vitro* sont très proches de ceux observés *in vivo* ou avec le foie de rat isolé perfusé tant d'un point de vue biochimique que morphologique. Ainsi, il est montré que la sévérité des lésions induites par la D-galactosamine *in vitro* dépend de l'âge des cultures traitées, les cultures plus âgées étant moins sensibles que les cultures plus fraîches, probablement à cause des phénomènes de dédifférenciations cellulaires. La dexaméthasone à la concentration de 10^{-6} M supprime l'action du toxique alors que la triiodo-L-thyronine à la concentration de 10^{-6} M l'augmente et aucune protection par les 2 macroglobulines n'a été observée ni *in vivo* ni *in vitro*. La diminution de la concentration en calcium extracellulaire aussi bien que l'addition d'inhibiteurs calcium/calmoduline ne modère pas l'intoxication des hépatocytes de sorte que l'hypothèse alléguant que la mort des cellules serait due à une augmentation du flux de calcium à l'intérieur des cellules est réfutée (TRAN-THI et al, 1985).

23. LES HEPATOTROPES.

Sous le terme d'hépatotropes sont regroupées diverses substances agissant sur différentes phases des maladies hépatiques. L'utilisation de ce terme est préférable à l'ancienne appellation d'hépto-protecteurs qui suggère un mécanisme protecteur général valable pour tous les aspects des maladies hépatiques. En effet, l'évolution des connaissances de la physiologie hépatique montre que la thérapeutique doit viser des objectifs différents selon les phases évolutives successives des affections du foie (PERRISSOUD 1981).

D'autre part, c'est sous la dénomination d'hépatotropes que sont répertoriées les diverses spécialités pharmaceutiques ayant un impact bénéfique sur le foie qui figurent dans le VIDAL. Les termes d'hépto-protecteurs et d'anti-hépatotoxiques sont cependant encore employés couramment.

La détection des potentialités hépatotropes des substances chimiques, naturelles ou de synthèse dans les modèles *in vitro* sur des hépatocytes de rongeur a été abordée le plus fréquemment par la mesure de la cytotoxicité au moyen de la quantification de la libération d'enzymes intracellulaires telles que la LDH, la GPT et la GOT.

Les processus plus particuliers visant à déceler par exemple l'effet vis à vis d'une lipoperoxydation ont essentiellement été basés sur la mesure de la malonaldéhyde formée lors de l'intoxication par un toxique de référence.

L'observation cytomorphologique des hépatocytes confrontés à la dualité du toxique mis en présence de substances supposées hépatotropes a été beaucoup plus rarement décrite. Certaines substances ont montré des potentialités hépatotropes

vis à vis de la phalloïdine et l'observation de la cytomorphologie des cellules intoxiquées a le plus souvent été prise comme critère d'évaluation de l'activité hépatotrope des substances antagonistes à tester telles que le (+)cyanidanol-3 (PERRISSOUD et al.1981), WANG et al.1985).

Dans la suite de cette partie sur les substances hépatotropes, testées sur le modèle des hépatocytes de rat en suspension, nous restreindrons notre analyse au cas particulier des substances pouvant modérer l'action toxique du CCl₄.

Les hépatocytes de rat fraîchement isolés en suspension, ont été peu employés pour détecter l'éventuelle activité hépatotrope de substances chimiques ou naturelles (et plus particulièrement vis à vis du tetrachlorure de carbone) (PERRISSOUD 1981, AGUIAR 1985).

Parce que les protocoles d'intoxication des cellules par le CCl₄ sont généralement différents comme nous en avons fait la remarque dans la partie 22, les résultats présentés dans la littérature sont par la même difficilement comparables.

STACEY et PRIESTLY (1978) intoxiquent des hépatocytes de rat durant 15 minutes en faisant diffuser 15 ul de CCl₄ dans des récipients fermés hermétiquement. Diverses substances chimiques protectrices du foie *in vivo* ont été testées. Aucune de ces substances testées (SKF 525 A, prométhazine, dibénamine, glutathion réduit, méthionine et cystéine) n'a pu protéger les cellules contre l'action toxique du CCl₄.

WANG et al.(1985) ont étudié l'effet du tryptophane et de la cystéine sur le CCl₄ *in vivo* et *in vitro*. En ajoutant le CCl₄ directement dans le milieu de culture des hépatocytes à la dose de 1 ul/ml de suspension, il est observé qu'après 60 minutes de traitement simultané, le tryptophane seul ne protège pas les hépatocytes alors que la cystéine diminue la toxicité du CCl₄. Lorsqu'il est ajouté de façon concomitante à la cystéine, le tryptophane potentialise son effet hépatoprotecteur. Les observations cytomorphologiques montrent que ces 2 acides aminés diminuent le nombre de bulles formées à la surface des hépatocytes traités avec le CCl₄. Les résultats présentés montrent une bonne corrélation entre les expériences *in vivo* et *in vitro*.

Lors d'essais pratiqués sur des hépatocytes de rat en suspension traités durant 4 heures, deux prostaglandines (la prostacyline et la 16,16 diméthyl PGE₂) utilisées en traitement curatif soit 30 minutes après addition du CCl₄ (300 ug/ml) ajouté directement au milieu de culture, ont diminué la toxicité du CCl₄. L'éthanol à la concentration de 1,5 ug/ml, ajouté pour stimuler la production des prostaglandines endogènes, provoque un effet cytoprotecteur en traitement préventif alors qu'il est sans effet sur le CCl₄ en traitement curatif (GUARNER et al.1985).

PERRISSOUD (1981) utilise 2 mM de CCl₄ dissout dans du DMSO et ajouté aux hépatocytes de rat en suspension sous un volume de 3,6 % pour intoxiquer les hépatocytes durant 20 minutes, il montre que la (+)catechine, la maringénine et une

série de flavonoides diminuent le relargage de la GOT lorsqu'ils sont ajoutés simultanément au toxique.

En utilisant le même modèle sur 55 molécules du groupe des flavonoides testées, les composés les plus hydrophiles inhibent la cytotoxicité du CCl₄ alors que les composés lipophiles la potentialisent (PERRISSOUD et TESTA 1986).

Un effet protecteur du L 114 est comparé à celui de la silymarine au regard du relargage de LDH et de GOT induit par le CCl₄ 2mM sur des hépatocytes de rat traités durant 120 minutes. Ces 2 produits diminuent la fuite des enzymes aussi bien lors de traitements simultanés que de traitements préventifs (AGUIAR 1985).

L'influence du Laennec (agent thérapeutique utilisé dans les affections hépatiques) sur une intoxication par le CCl₄ 5 et 10 mM est étudiée sur 2 modèles d'hépatocytes de rat en culture. Lorsque les hépatocytes en suspension sont traités durant une heure par le Laennec en même temps que le CCl₄, la fuite de GOT augmente par rapport au toxique seul. Lorsque la même expérience est reproduite sur des hépatocytes en culture primaire âgés de 24 heures, le Laennec diminue la fuite de GOT induite par le CCl₄. Les auteurs concluent qu'il est préférable d'utiliser des hépatocytes en culture primaire plutôt que des hépatocytes en suspension pour évaluer l'effet d'agents thérapeutiques sur les dysfonctionnements hépatiques (SAKAMOTO et al.1986).

L'influence de substances hépatotropes a été davantage étudiée sur les modèles d'hépatocytes de rat en culture primaire que sur les suspensions mais peut-être pas pour les raisons citées par SAKAMOTO! Dans la suite de cette analyse, nous retiendrons essentiellement les articles qui relatent les effets hépatotropes de substances d'origine naturelle. Force est de constater que ce domaine constitue l'apanage presque exclusif des chercheurs du pays du soleil levant.

NAKAGAWA et al.(1985) ont testé, vis à vis du CCl₄ 10 mM, l'activité hépatotrope de 10 composés provenant d'*Allium sativum formapekinense*, d'*Eleutherococcus senticosus* et de *Panax ginseng*. Les relargages de GPT montrent qu'après 60 minutes de traitement simultané, les extraits qui contiennent les concentrations les plus faibles de syringaresinol contenu dans le ciuwijia sont les plus actives.

Mais c'est sans nul doute l'équipe de KISO et HIKINO qui fournit depuis 1983 la littérature la plus abondante sur les recherches d'activités anti-hépatotoxiques des extraits végétaux au moyen des hépatocytes de rat en culture primaire. Leur démarche scientifique les a amenés à évoluer à partir de modèles *in vivo* sur la souris intoxiquée par le CCl₄ (HIKINO et al.1979, KISO et al.1982) vers les modèles *in vitro* sur hépatocytes de rat en culture primaire intoxiqués soit par le CCl₄ 10 mM pour des tests à court terme (60 minutes) soit par la D-galactosamine pour

des tests à plus long terme (30 heures) (KISO et al.1983a, 1983c). Ces 2 publications constituent les bases des validations de leurs modèles sur ces 2 substances hépatotoxiques de référence. Les avantages des hépatocytes de rat sur les hépatocytes de souris ont été établis. Les conditions optimales d'intoxication sont : CCl₄ 10 mM solubilisé dans l'éthanol et ajouté sous un volume de 1 % avec un temps de traitement de 60 minutes sur des cultures de 24 heures (KISO et al.1983a) et D-galactosamine 0,5 mM avec un temps de traitement de 30 heures intoxicant les cellules après 90 minutes d'attachement (KISO et al.1983c). La mesure de la fuite de GPT est prise comme marqueur de la cytotoxicité des substances testées en traitements simultanés.

La disponibilité de ces 2 modèles permet à cette équipe de cribler chaque année un nombre considérable de substances d'origine naturelle ou de synthèse pouvant présenter une activité hépatotrope.

Une revue assez exhaustive, présentant sous forme de tableaux synthétiques les principes actifs anti-hépatotoxiques et les plantes étudiées sur les modèles d'hépatocytes de rat en culture primaire a été récemment établie (LEXA 1988). Dans la suite de cette partie bibliographique, nous décortiquerons certaines de ces publications afin d'illustrer la diversité des phénomènes qui peuvent être abordés par les études *in vitro* sur les hépatocytes.

Trois curcuminoides extraits de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) ont montré des activités anti-hépatotoxiques comparables vis à vis du CCl₄ 10 mM (les fuites de GPT et de GOT sont prises comme marqueurs de la cytotoxicité) et vis à vis de la D-galactosamine 0,5 mM (la fuite de GPT est prise comme marqueur de la cytotoxicité). Les effets sont nets aux doses de produit les plus élevées (1 mg/ml). Ces doses élevées sont cependant comparables aux doses de glycyrrhizine et de silybine prises comme substances hépatotropes de référence (KISO et al.1983a, 1983c). Parmi les dérivés des curcuminoides tel que l'acide cinnamique et ses analogues, seul l'acide cafféique montre une activité anti-hépatotoxique significative à la dose de 0,1 mg/ml et très significative à la dose de 1 mg/ml (KISO et al.1983d).

Faisant suite à cette étude sur les Zingiberaceae, différents principes actifs (gingerols, shogaols, diarylheptanoides et leurs analogues) ont montré des effets anti-hépatotoxiques vis à vis du CCl₄ 10 mM en relation effet/dose mais les résultats obtenus vis à vis de la D-galactosamine 0,5 mM ne sont pas toujours concordants avec ceux obtenus avec le CCl₄. Après 30 heures de traitement, l'évaluation de la cytotoxicité des produits anti-hépatotoxiques montre que toutes les substances testées augmentent la fuite de GPT par rapport au lot témoin non traité, surtout pour la concentration la plus élevée (1 mg/ml) ce qui explique les difficultés

rencontrées par les auteurs pour expliquer les résultats vis à vis de la D-galactosamine. En se penchant plutôt sur les résultats obtenus vis à vis du CCl₄, les auteurs concluent à l'activité anti-hépatotoxique des dites substances. La longueur de la chaîne linéaire des gingerols et des shogaols ainsi que la présence de radicaux OH sur les groupements phényl des diarylheptanoïdes aurait un rôle important pour l'activité anti-hépatotoxique (HIKINO et al.1985b).

Différents extraits méthanoliques de rhizomes d'*Atractylodes ovata* DeCandolle, d'*A. japonica* Koidzumi et d'*A. lanceae* DeCandolle testés à la dose de 1 mg/ml vis à vis du CCl₄ 10 mM et de la D-galactosamine 0,5 mM montrent des effets anti-hépatotoxiques comparables sur les 2 modèles mais des variations d'activités sont mises en évidence selon les lots testés. Trois sesquiterpénoïdes extraits des rhizomes d'*Atractylodes* (attractylon, bêta-eudesmol et hinesol) sont anti-hépatotoxiques vis à vis du CCl₄ et de la D-galactosamine mais trois lactones sesquiterpéniques (attractylénoïdes I, II et III) qui sont des dérivés oxydés de l'attractylon ne sont pas anti-hépatotoxiques. Les 3 sesquiterpénoïdes ne sont pas cytotoxiques aux doses actives (KISO et al.1983b).

Dans une étude complémentaire, l'effet de l'attractylon sur la génération de radicaux libres et la lipoperoxydation est évalué avec des microsomes de foie de rat traités soit par le CCl₄, soit par l'ADP/Fe³⁺ ou l'ascorbate/Fe²⁺. L'attractylon diminue la formation de malonaldéhyde dans les 3 modèles mais produit lui-même des radicaux libres en relation de dose, soit seul, soit avec le CCl₄. Un effet de compétition au cours duquel l'attractylon piègerait les radicaux libres CCl₃ est proposé par les auteurs (KISO et al.1985).

Plusieurs extraits méthanoliques d'épis d'*Artemisia capillaris* Tunberg (Compositae) testés *in vivo* chez la souris pour leurs propriétés anti-hépatotoxiques vis à vis du CCl₄ montrent qu'il existe des différences importantes d'activité selon la provenance et la date de récolte des plantes, ce qui peut expliquer les variations dans l'efficacité des préparations commerciales. Parmi 13 flavonoïdes extraits des bourgeons d'*Artemisia capillaris*, la capillarisine est la plus efficace pour protéger les hépatocytes de rat vis à vis du CCl₄ 10 mM ou de la D-galactosamine 0,5 mM. La capillarisine à la dose de 1 mg/ml diminue la fuite naturelle de la GPT après 30 heures de traitement comparée au lot témoin non traité. A titre de comparaison, la quercétine (prise comme substance anti-hépatotoxique de référence) augmente la fuite naturelle de la GPT comparée au lot témoin non traité. Les auteurs n'expliquent pas cette discordance apparente (KISO et al.1984b).

Parmi 22 lignanes extraites des fruits de *Schizandra chinensis* Baillon (Schizandraceae) et un extrait de *Kadsura japonica* Dunnell (Schizandraceae), la majorité de ces produits montre une activité anti-hépatotoxique plus marquée vis à vis du CCl₄ 10 mM que vis à vis de la D-galactosamine 0,5 mM. A forte concentration (1 mg/ml) les produits augmentent la fuite de GPT

après 30 heures de traitement comparé au lot témoin non traité. Un effet cytotoxique s'ajouterait à l'effet anti-hépatotoxique lors des temps de traitement de 30 heures. L'analyse des relations structure/activité suggère que les groupements méthylènedioxy placés sur les squelettes dibenzocyclooctanes pourraient jouer un rôle important dans l'activité anti-hépatotoxique (HIKINO et al.1984b).

Afin d'élucider le mécanisme d'action de cet effet hépatotrope, 2 de ces lignanes (le wuweizisu C et le gomicine A) sont testés sur des microsomes de foie de rat, traités soit par le CCl_4 , soit par l'ADP/ Fe^{3+} ou l'ascorbate/ Fe^{2+} . Ces 2 substances n'inhibent pas la formation de radicaux libres $\cdot\text{CCl}_3$ mais diminuent la lipoperoxydation induite par le CCl_4 et la réaction enzymatique avec l'ADP/ Fe^{3+} mais pas avec la réaction non enzymatique avec l'ascorbate/ Fe^{2+} . Parce que l'effet inhibiteur est plus marqué dans le cas de l'ascorbate/ Fe^{2+} que dans le cas de l'ADP/ Fe^{3+} , l'action anti-oxydante ne serait pas liée à un phénomène enzymatique. D'autre part, ces 2 substances n'ont pas modifié l'influx de l'ion calcium extracellulaire qui est proposé comme une des raisons de la mort des cellules lors des processus de lipoperoxydation (KISO et al.1985b, CASSINI et al.1981).

Parce que ces lignanes sont des dérivés dibenzocyclooctanes, l'activité anti-hépatotoxique des dérivés de l'acide diphénique dont la structure du squelette carboné correspond à un produit de dégradation du dibenzocyclooctane ont été testés vis à vis du CCl_4 10 mM et de la D-galactosamine 0,5 mM. La plupart de ces analogues de tanins diminuent la cytotoxicité des produits toxiques de référence marquée par la mesure de la GPT relarguée. Cependant, la mesure de l'activité enzymatique d'un sérum témoin auquel sont ajoutés les tanins révèle que la plupart d'entre eux interfèrent directement sur le dosage. De ce fait, seules quelques molécules pourraient nourrir l'espoir d'un avenir prometteur dans le traitement des hépatites (HIKINO et al.1985a).

Le Chardon-marie *Silybum marianum* Gaertner (Compositae ou mieux Asteraceae) est certainement la plante la plus étudiée pour ses activités hépatotropes aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Le 3-oxyflavone silymarine est un principe actif extrait des fruits du Chardon-marie et il est constitué d'un mélange de 3 flavonolignanes isomères : la silybine, la silydianine et la silychristine. La silybine serait le composé le plus actif (HAHN et al.1968). Cette molécule montre une nette activité anti-hépatotoxique sur les hépatocytes de rat en culture primaire traités par le CCl_4 10 mM (KISO et al.1983a). Plusieurs flavonolignanes extraits du Chardon-marie inhibent la fuite de GPT produite soit par le CCl_4 10 mM (silandrine, 3-deoxysilychristine, silybine et silymonine) soit par la D-galactosamine 0,5 mM (silydianine et silymonine). Dans tous les cas, les doses efficaces sont les concentrations testées les plus élevées (1 mg/ml) mais malheureusement, ces doses entraînent une forte libération de GPT dans les essais de cytotoxicité durant 30 heures. Toutes ces substances interfèrent partiellement sur le dosage de la GPT lorsque les concentrations de 1 mg/ml sont testées par rapport à un sérum contrôle, exceptée la

3-deoxysilychristine qui inhibe totalement l'activité de l'enzyme (HIKINO et al.1984c).

A partir d'extraits de racines de *Glycyrrhiza glabra* L. (Leguminosae), la glycyrrhizine et ses analogues (triterpénoides) dont l'acide 18-béta-glycyrrhétinique montrent une activité anti-hépatotoxique vis à vis du CCl₄ 10 mM et de la D-galactosamine (KISO et al.1984a). L'influence de ces substances sur la lipoperoxydation induite par le CCl₄ n'a pu être évaluée dans le modèle des hépatocytes de rat en culture primaire à cause du manque de sensibilité du dosage de la malonaldéhyde formée. En revanche, avec des microsomes de foie de rat, une activité antiperoxydante de l'acide 18-béta-glycyrrhétinique (1 mg/ml) à pu être mise en évidence soit avec le CCl₄ (activité inférieure à celle de la vitamine E 1mg/ml), soit avec l'ADP/Fe³⁺ ou l'ascorbate/Fe²⁺ (activité supérieure à celle de la vitamine E 1mg/ml).

D'autres triterpénoides (papirogénines et papyriosides) extraits des feuilles de *Tetrapanax papyriferum* Koch (Araliaceae) montrent une activité anti-hépatotoxique vis à vis du CCl₄ et dans une moindre mesure vis à vis de la D-galactosamine, ce qui peut s'expliquer par la toxicité intrinsèque des produits à forte dose (1 mg/ml). Les dérivés glycosidés sont inefficaces (HIKINO et al.1984).

La phyllanthine et l'hypophyllantine obtenue par extraction à l'hexane d'un extrait brut de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) ont un effet anti-hépatotoxique vis à vis du CCl₄ 10mM et de la D-galactosamine 0,5 mM (SYAMASUNDAR et al.1985).

Après une suite d'extraction au méthanol puis à l'acétate d'éthyl/eau de fleurs de *Butea monosperma* Kuntze (Fabaceae), la fraction butanol qui contient les flavonoïde se montre la plus efficace contre la toxicité du CCl₄ 10 mM ou de la D-galactosamine 0,5 mM. L'isobutirine et la butirine (qui sont 2 flavonoïdes) ont une activité anti-hépatotoxique plus marquée contre la D-galactosamine que contre le CCl₄, l'isobutirine est plus efficace que la butirine, elle-même plus efficace que la silybine prise comme hépatotrope de référence. Cependant, les auteurs préfèrent ne pas tirer de conclusion sur ces substances actives *in vivo* et *in vitro* tant que des données sur le métabolisme et la pharmacocinétique n'auront pas été élucidées (WAGNER et al.1986).

Plusieurs constituants extraits des bulbes d'*Allium sativum* L. (Liliaceae) montrent des activités anti-hépatotoxiques tant dans des modèles *in vivo* (sur des rats intoxiqués par la D-galactosamine) qu'*in vitro* sur les hépatocytes de rat en culture primaire (intoxiqués par le CCl₄ 10 mM ou par la D-galactosamine 0,5 mM) ou bien encore sur des microsomes de foie de rat (traités soit par le CCl₄, l'ADP/Fe³⁺ ou l'ascorbate/Fe²⁺) (HIKINO et al.1986).

Enfin, à titre d'exemple et pour illustrer l'intérêt que peut représenter la maîtrise d'un modèle de criblage *in vitro*, 129 extraits de plantes issues de la pharmacopée de Formose ont été testés pour leur activité anti-hépatotoxique potentielle. La majorité des produits présente une certaine efficacité dans les modèles au CCl₄ ou à la D-galactosamine, confirmant ainsi l'usage traditionnel de ces drogues (YANG et al.1987).

La suite d'informations que nous venons d'exposer n'avait pas pour but d'être exhaustive ni de passer en revue toutes les substances potentiellement hépatotropes ayant fait l'objet d'études *in vitro*. Nous avons simplement tenté d'illustrer par quelques exemples ce qu'il était possible de réaliser avec de tels modèles. Les exemples choisis montrent que certaines substances (rares) donnent des résultats comparables dans plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro* (extraits d'*Allium sativum* L.) mais que bien souvent, les résultats sont variables selon le modèle expérimental et surtout qu'il faut prendre garde aux conclusions éronnées auxquelles la simple analyse de résultats chiffrés peut mener (problèmes de l'interférence des substances testées à fortes doses sur les dosages biochimiques). Enfin, nous avons vu que bien des substances actives dans les expériences à court terme avec le CCl₄ sont à la fois toxiques quand elles sont testées sur 30 heures.

3. MATERIEL ET METHODE.

31. PREPARATION DES EXTRAITS DE PLANTE.

311. EXTRAITS AQUEUX BRUTS D'*Eupatorium cannabinum*.

3111. L'EXTRAIT E 5141-3A.

L'extrait aqueux brut de la plante *Eupatorium cannabinum* L. (Asteraceae) codé E 5141-3A a été réalisé à partir de la matière première de plante entière codé RT 371 lot 813.404 fournie par PHYTO-EST.

La préparation a été effectuée par le service de galénique du Centre de Recherches SANOFI (route de toulouse) selon les indications du Centre des Sciences de l'Environnement conformément aux recommandations des médecines traditionnelles.

Les quantités mises en oeuvre sont :

- 180 g d'Eupatoire RT 371
- 3000 g d'eau purifiée

Le mode de fabrication a consisté en une décoction (10 minutes à ébullition) puis macération (24 heures à 40 degrés C) suivi d'une filtration sur tamis de 0,40 mm de vide de maille. Rinçage des fractions végétales retenues sur le filtre avec de l'eau purifiée et ajustement du volume à 3000 ml final. Filtration de l'extrait sur préfiltre en fibre de verre (AP 20 diamètre 124 mm). L'extrait E 5141-3A est obtenu après lyophilisation de 1000 ml d'extrait aqueux par plateaux successifs jusqu'à complète dessiccation.

Le rendement est : 1 litre d'extrait aqueux donne 8,6 g de lyophilisat E 5141-3A ou 100 mg de lyophilisat = 680 mg de plante sèche.

3112. L'EXTRAIT RT 1096.

A partir de 300 kg d'Eupatoire fournis par PHYTO-EST, l'extrait RT 1096 a été réalisé selon un procédé pilote de fabrication semi-industriel par l'usine CPE (SPI) à Chateauneuf.

Le mode de fabrication a consisté en une digestion à 80 degrés C pendant 30 minutes avec recirculation de l'extrait, dans l'eau potable (QSP couvrir la plante). Filtration permettant de recueillir l'extrait aqueux, concentration sous vide jusqu'à obtenir un extrait contenant 40 % du résidu sec et séchage final sur tambour chauffé à la vapeur.

La quantité récupérée est 39,7 kg.

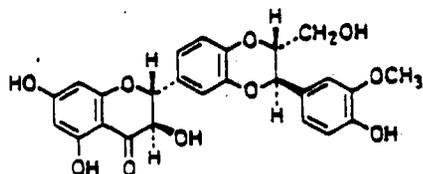
Le rendement est : 100 mg de poudre = 780 mg de plante sèche.

312. EXTRAIT PURIFIE DE *Silybum marianum*.

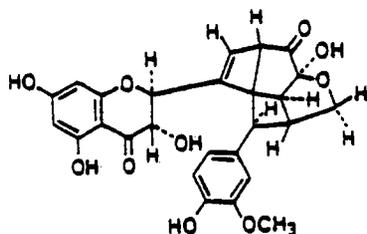
La silymarine est un des principes actifs reconnu pour ses propriétés hépatotropes et isolé à partir du Chardon-Marie. Cette molécule est constituée par l'association de 3 flavonolignanes de structure isomérique (figure 2) :

la silybine + la silydianine + la silycristine

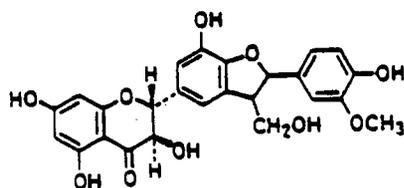
Les laboratoires Roger Bellon nous ont fourni gracieusement le produit purifié référencé sous le numéro de lot 85-1251. Nous n'avons pas eu connaissance du certificat de libération ni du bulletin d'analyse ni de la date de péremption.



Silybin



Silydianin



Silychristin

Figure 2 : STRUCTURE CHIMIQUE DES ISOMERES COMPRIS DANS LA SILYMARINE.

(d'après VALENZUELA et al.1986).

32. PREPARATION DES HEPATOCYTES *in vitro* ET TRAITEMENTS.

321. HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION.

3211. METHODE D'OBTENTION.

Les hépatocytes sont isolés à partir des foies de rats mâles Sprague Dawley (Iffa Crédo) d'un poids de 300 ± 50 g, nourris et abreuvés *ad libitum* et stabulés en animalerie depuis au moins une semaine après arrivage.

Les hépatocytes sont isolés *in situ* selon la méthode de BERRY et FRIEND (1969) modifiée par SEGLEN (1976) et adaptée au laboratoire avec quelques modifications mineures (ARVIS 1985).

Après anesthésie de l'animal au Pentobarbital sodique (Clin Midy) 60 mg/kg en IP et injection d'héparine 50 FOURNIER^R (1 ml/kg en IP), le rat est placé dans une enceinte thermostatée à 37 ± 1 degré C en décubitus dorsal. Une incision médioventrale de l'abdomen est pratiquée et la veine porte hépatique est cathétérisée (Cathéter Cathlon IV, Critikon). Le foie est perfusé à un débit de 30 ml/min. par une solution saline de Hanks sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ ni rouge de phénol (Eurobio) maintenue au bain marie à 37 degrés C, pH = 7,4 et oxygénée continuellement par du carbogène 95 % O₂ / 5 % CO₂. Très rapidement, la veine cave inférieure est sectionnée sous les veines rénales. La veine cave supérieure est cathétérisée via l'atrium cardiaque droit après ouverture de la cage thoracique. La veine cave inférieure est ligaturée au dessus des veines rénales. Après 5 à 10 minutes de passage de ce perfusat destiné au lavage du foie, le liquide de perfusion est remplacé par une solution saline de Hanks contenant 5 mM de CaCl₂ et 0,025 % de collagénase (Boehringer). Le débit est ajusté à 15 ml/min. et la perfusion se poursuit avec recirculation pendant 15 à 20 minutes afin d'obtenir un foie décoloré mou et flasque. Le foie est excisé et transféré dans une boîte de Pétri. La capsule de Glisson est déchirée en plusieurs points et les hépatocytes sont dispersés délicatement dans du Milieu Essentiel Minimum de Eagle (Flow Laboratories) pH = 7,4 additionné d'Hépes (Sigma) 10 mM et maintenu à 37 degrés C après avoir été oxygéné copieusement. La suspension ainsi obtenue est filtrée sur soie à blutter de 68 um de vide de maille et centrifugée 3 fois à 50 g pendant 2 minutes. Après chaque centrifugation, le culot est remis en suspension dans le MEM.

La viabilité cellulaire est mesurée à la cellule de comptage de Malassez par le test classique d'exclusion du bleu Trypan comme décrit au paragraphe 331. Par cette méthode, le nombre d'hépatocytes viables obtenus est généralement supérieur à 400×10^6 et la viabilité initiale supérieure à 90 %.

3212. TESTS DE CYTOTOXICITE.

La concentration de la suspension d'hépatocytes purifiés est ajustée à 2×10^6 cellules/ml dans le MEM.

Après environ 30 minutes (délai laissé aux hépatocytes pour "récupérer" des lésions membranaires occasionnées par la perfusion), les hépatocytes sont répartis dans des erlenmeyers de 25 ml en verre sous des fractions aliquotes de 2 ml par fiole et mis en agitation au bain marie à 37 degrés C, 70 oscillations/min.. Chaque récipient est bouché par une double épaisseur de parafilm et gasé par du carbogène 95 % O₂ / 5 % CO₂ au moyen d'un réseau de tuyaux en ramifications dichotomiques à l'extrémité desquels sont ajustées des aiguilles permettant ainsi une oxygénation individuelle avec des débits égaux.

Conditions A :

Le CCl₄ est solubilisé et dilué dans le solvant et ajouté aux cellules sous un volume de 5 % (v/v).

Conditions B :

Le CCl₄ est solubilisé et dilué dans le solvant et ajouté au cellules sous un volume de 1 % (v/v).

Conditions C :

L'extrait de plante est solubilisé et dilué extemporanément dans le milieu de culture MEM afin d'obtenir une solution mère (x20) qui permette de traiter les cellules en ajoutant le produit à tester sous un volume de 100 ul soit 5 % (v/v) pour un volume final de 2 ml.

Conditions D :

L'extrait de plante est solubilisé et dilué extemporanément dans le milieu de culture MEM afin d'obtenir une solution mère (x100) qui permette de traiter les cellules en ajoutant le produit à tester sous un volume de 20 ul soit 1 % (v/v) pour un volume final de 2 ml.

3213. TESTS DE PROTECTION.

32131. TRAITEMENT SIMULTANE.

Le produit supposé hépatotrope est ajouté aux hépatocytes en même temps que le produit toxique de référence.

Conditions A :

Le CCl₄ 4 mM solubilisé dans le DMSO est ajouté aux cellules sous un volume de 1 %. et l'extrait de plante est solubilisé et dilué extemporanément dans le milieu de culture MEM afin d'obtenir une solution mère (x100) qui permette de traiter les cellules en ajoutant le produit à tester sous un volume de 1% (v/v) pour un volume final de 2 ml. Le temps de traitement est de 30 minutes.

Conditions B :

Le CCl₄ 10 mM solubilisé dans l'éthanol est ajouté aux cellules sous un volume de 1 %. et l'extrait de plante est solubilisé et dilué extemporanément dans le milieu de culture MEM afin d'obtenir une solution mère (x100) qui permette de traiter les cellules en ajoutant le produit à tester sous un volume de 1% (v/v) pour un volume final de 2 ml. Le temps de traitement est de 60 minutes.

32132. TRAITEMENT PREVENTIF.

Le produit supposé hépatotrope est ajouté aux hépatocytes avant le produit toxique de référence.

Le CCl₄ 8 mM solubilisé dans le DMSO est ajouté aux cellules sous un volume de 1 %. et l'extrait de plante est solubilisé et dilué extemporanément dans le milieu de culture MEM afin d'obtenir une solution mère (x100) qui permette de traiter les cellules en ajoutant le produit à tester sous un volume de 1% (v/v) pour un volume final de 2 ml. Le temps de traitement par le CCl₄ est de 30 minutes et le temps de prétraitement par l'extrait de plante est variable de 30 à 120 minutes.

322. HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE.

3221. METHODE D'OBTENTION.

Les hépatocytes sont isolés à partir des foies de rats mâles Sprague Dawley (Iffa Crédo) d'un poids de 200 ± 50 g ou Fischer (Charles River) d'un poids de 250 ± 50 g, nourris et abreuvés *ad libitum* et stabulés en animalerie (conforme aux normes BPL) depuis au moins une semaine après arrivage.

La technique utilisée est celle décrite par WILLIAMS (1977).

Après anesthésie de l'animal au Pentobarbital sodique (Clin Midy) 60 mg/kg en IP, le rat est positionné en décubitus dorsal et aspergé d'éthanol à 70 %. Une incision médioventrale de la symphyse pubienne à l'appendice xyphoïde est pratiquée. La veine porte hépatique est dégagée, une aiguille à ailette (20G) y est introduite et un clamp est placé sur l'aiguille en place. Le foie est perfusé par la solution de lavage (annexe 11). Très rapidement, la veine cave inférieure est sectionnée au dessous des veines rénales afin de permettre l'écoulement du perfusé. Le débit est ajusté à 40 ml/min. et le foie se décolore. La cage thoracique est ouverte et le ventricule cardiaque droit est sectionné. La veine cave inférieure est clampée au dessus des veines rénales de telle sorte que le perfusé puisse s'échapper au niveau thoracique. Après quelques minutes, le foie est perfusé par la solution de dissociation (annexe 12) sans recirculation et le débit est réduit à 20 ml/min.. Pendant toute la durée de l'opération, le foie est couvert d'une gaze stérile auto-humidifiée par le perfusé s'échappant du coeur et le rat est maintenu à une température voisine de 37 degrés C au moyen d'une lampe d'éclairage placée au dessus de l'animal. La perfusion s'achève au bout de 10 à 15 minutes. Le foie est prélevé soigneusement et transféré dans une boîte de Pétri stérile (Falcon 3003). Sous hotte à flux laminaire, environ 40 ml de solution de dissociation sont ajoutés sur le foie et la capsule de Glisson est ouverte en plusieurs points. Le foie est délicatement agité dans la boîte de Pétri afin de permettre une désagrégation progressive du tissu hépatique. Le tissu conjonctif et le système artériovoineux sont écartés, ne laissant dans la boîte de Pétri que les cellules dissociées en suspension. Le milieu de dissociation est neutralisé par du milieu de WILLIAMS complet (annexe 21) et la suspension est centrifugée 2 fois à 50g durant 40 secondes (Centrifugeuse réfrigérée Beckman TJ-6 + TJ-R) après chaque centrifugation, les culots sur remis en suspension dans du milieu WME complet. A la fin de cette suite de lavages, la suspension d'hépatocytes est transvasée dans un erlenmeyer en plastique stérile de 250 ml (Corning 98819).

La viabilité cellulaire est mesurée à la cellule de comptage de Neubauer par le test classique d'exclusion du bleu Trypan comme décrit au paragraphe 331. Par cette méthode, le nombre d'hépatocytes viables obtenus est généralement supérieur à 400×10^6 et la viabilité initiale supérieure à 90 %.

3222. TESTS DE CYTOTOXICITE.

32221. METHODE CLASSIQUE.

Des boîtes de cultures (Falcon 3002) sont ensemencées à raison de 2×10^6 cellules viables par boîte (70 000 cellules/cm²) dans 3 ml de milieu de WILLIAMS complet. Les boîtes sont placées dans un incubateur pour culture de cellules (37 degrés C, 5 % CO₂ / 95 % air, humidité saturante). Après 2 à 3 heures nécessaires à l'attachement des hépatocytes au support, le milieu est éliminé par aspiration et les boîtes sont lavées 1 fois avec du milieu de culture pour ôter les quelques débris et cellules mortes résiduels avant que les cultures ne soient traitées suivant les protocoles *ad hoc*.

Conditions A :

Le CC14 10 mM solubilisé dans le DMSO est ajouté aux cultures sous un volume de 1 %. Le milieu de traitement des hépatocytes est le EMEM incomplet (annexe 22).

Conditions B :

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le milieu EMEM complet (annexe 22) et ajoutée aux cellules sous un volume de 1 ml QSP 3 ml final (solution mère x3) pour un temps de traitement de 24 heures.

Conditions C :

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le milieu WME complet ou incomplet (annexe 21) et ajoutée aux cellules sous un volume de 1 ml QSP 3 ml final (solution mère x3) pour un temps de traitement de 29 heures.

Conditions D :

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le milieu L 15 complet (annexe 23) et ajoutée aux cellules sous un volume de 3 ml QSP 3 ml final (solution mère x1) pour un temps de traitement de 24 heures après lequel le milieu est prélevé pour les dosages et remplacé par du milieu L 15 complet sans D-galactosamine ainsi qu'à chaque nouveau prélèvement au moins toutes les 24 heures.

Conditions E :

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le milieu EMEM complet (annexe 22) et ajoutée aux cellules sous un volume de 3 ml QSP 3 ml final (solution mère x1) pour un temps de traitement de 22 heures après lequel le milieu est prélevé pour les dosages et remplacé par du milieu L 15 complet sans D-galactosamine ainsi qu'à chaque nouveau prélèvement au moins toutes les 24 heures.

Conditions F :

Les extraits de plante sont solubilisés et dilués extemporanément dans le milieu de culture EMEM incomplet (annexe 22). La solution mère (x3) est filtrée sur membrane filtrante (acrodisque 0,45 um) afin de pouvoir ajouter les produits à tester sous un volume de 1 ml QSP 3 ml final.

Conditions G :

Le produit à tester est solubilisé et dilué dans le DMSO (Merck) et ajouté aux cultures sous un volume de 30 ul QSP 3 ml final soit 1 % (v/v.).

32222. MICROMETHODE.

Des plaques de microculture 96 puits (Nunc Microwell 1.67008 ou Falcon Plaques Microtest III 3072) sontensemencées à raison de 30.000 hépatocytes viables par puit sous un volume de 100 ul en milieu WME complet + insuline 10^{-6} M + hydrocortisone 10^{-5} M (annexe 21). Les plaques de microculture sont placées dans un incubateur pour culture de cellules (37 degrés C, 5 % CO₂ / 95 % air, humidité saturante). Après 2 à 3 heures nécessaires à l'attachement des hépatocytes au support, le milieu est éliminé par aspiration à la pipette multicanaux. Pour le traitement des hépatocytes, les extraits de plante sont solubilisés et dilués extemporanément dans le milieu de culture WME complet. La solution mère (x1) est filtrée sur membrane filtrante (acrodisque 0,45 um) afin de pouvoir ajouter les produits à tester sous un volume de 100 ul QSP 100 ul final.

3223. TESTS DE PROTECTION.

32231. TRAITEMENT SIMULTANE.

Le produit supposé hépatotrope est ajouté aux hépatocytes en même temps que le produit toxique de référence.

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le milieu WME complet (annexe 21) afin d'obtenir une concentration de 5 mM et les extraits de plante sont solubilisés et dilués extemporanément dans le milieu de culture, la solution mère est filtrée sur membrane filtrante (acrodisque 0,45 um). Afin de pouvoir ajouter les produits à tester sous un volume de 1,5 ml (chaque solution est x2) pour un volume final de 3 ml.

32132. TRAITEMENT PREVENTIF.

Le produit supposé hépatotrope est ajouté aux hépatocytes avant le produit toxique de référence.

Le CCl₄ 10 mM solubilisé dans le DMSO est ajouté aux cultures sous un volume de 1 % et les extraits de plante sont solubilisés et dilués extemporanément dans le milieu de culture, la solution mère est filtrée sur membrane filtrante (acrodisque 0,45 µm). Les hépatocytes sont prétraités par l'extrait de plante durant 29 heures avant l'ajout du CCl₄ durant 60 minutes.

323. HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE.

3231. METHODE D'OBTENTION.

Les hépatocytes sont isolés à partir de foies entiers sains provenant de donneurs accidentés et en coma dépassé ou de biopsies provenant de patients présentant des métastases hépatiques et ayant subi une hépatectomie partielle (Professeur JOYEUX du Centre Paul Lamarque à Montpellier). Dans le cas des biopsies, la partie saine du lobe de foie prélevée est perfusée selon la méthode décrite par FABRE et al. (1988), CANO et al. (1989).

Une fois que les hépatocytes sont isolés, ceux-ci sont mis en suspension dans du milieu ISOM (annexe 24). La viabilité cellulaire est mesurée à la cellule de comptage de Neubauer par le test classique d'exclusion du bleu Trypan comme décrit au paragraphe 331. Par cette méthode, le nombre d'hépatocytes viables obtenus est variable suivant la masse de tissu hépatique perfusé et la viabilité initiale est généralement supérieure à 80 %.

Des dosages biochimiques (FABRE et al. 1988) ont montré que les hépatocytes présumés normaux présentaient les mêmes caractéristiques (inductions d'enzymes etc...) que les hépatocytes provenant de donneurs sains.

3232. TESTS DE CYTOTOXICITE.

Des boîtes de cultures (FALCON 3002) pelliculées par du collagène (annexe 3) sontensemencées à raison de 2 à 2,5 x 10⁶ cellules viables par boîte (0,7 10⁵ à 10⁵ cellules/cm²) dans 3 ml de milieu de WILLIAMS complet. Les boîtes sont placées dans un incubateur pour culture de cellules (37 degrés C, 5 % CO₂ / 95 % air, humidité saturante). Après environ 12 heures nécessaires à l'attachement des hépatocytes au support, le milieu est éliminé par aspiration et les boîtes sont lavées 1 fois avec du milieu de culture pour ôter les quelques débris et cellules mortes résiduels avant que les cultures ne soient traitées suivant les protocoles *ad hoc*.

Conditions A :

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le milieu L 15 complet (annexe 23) et ajoutée aux cellules sous un volume de 3 ml QSP 3 ml final (solution mère x1) pour un temps de traitement de 20 heures après lequel le milieu est prélevé pour les dosages et remplacé par du milieu L 15 complet sans D-galactosamine ainsi qu'à chaque nouveau prélèvement au moins toutes les 24 heures.

Condition B :

Les extraits de plante sont solubilisés et dilués extemporanément dans le milieu de culture L 15 complet (annexe 23). La solution mère (x1) est filtrée sur membrane filtrante (acrodisque 0,45 μ m) afin de pouvoir ajouter les produits à tester sous un volume de 3 ml QSP 3 ml final.

3233. TESTS DE PROTECTION.

Le produit supposé hépatotrope est ajouté aux hépatocytes en même temps que le produit toxique de référence.

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le milieu L 15 complet (annexe 23) afin d'obtenir une concentration de 5 mM et les extraits de plante sont solubilisés et dilués extemporanément dans le milieu de culture, la solution mère est filtrée sur membrane filtrante (acrodisque 0,45 μ m). Afin de pouvoir ajouter les produits à tester sous un volume de 1,5 ml (chaque solution est x2) pour un volume final de 3 ml. Après un temps de traitement de 22 heures, le milieu est prélevé pour les dosages et remplacé par du milieu L 15 complet sans D-galactosamine ni extraits de plante ainsi qu'à chaque nouveau prélèvement au moins toutes les 24 heures.

Nota bene : le résumé des opérations de recherche d'un effet cytotoxique ou hépatotrope des produits sur les hépatocytes en culture est présenté dans la figure 3

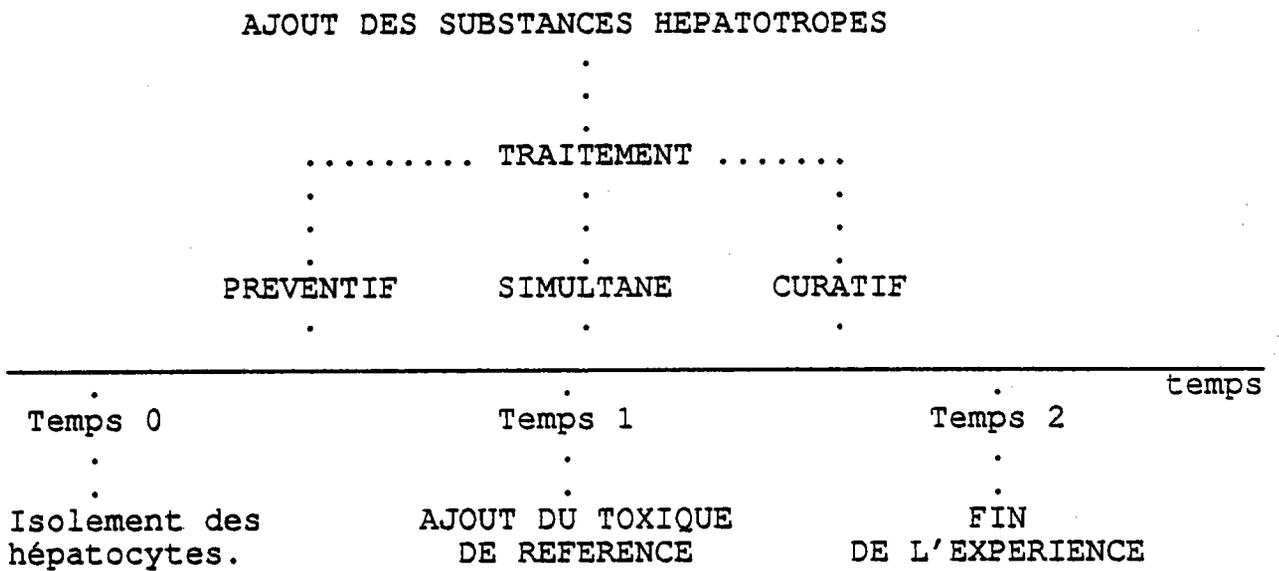


Figure 3 : PROTOCOLES D'ETUDE DES SUBSTANCES CYTOTOXIQUES OU HEPATOTROPES POUVANT ETRE TESTEES DANS LES MODELES D'HEPATOCYTES EN CULTURE.

33. DOSAGES BIOCHIMIQUES ET COLORIMETRIQUES.

331. TEST D'EXCLUSION DU BLEU TRYPAN.

Ce test colorimétrique est un test rapide qui présente l'avantage de pouvoir à la fois révéler les altérations de la cellule tout en permettant de déterminer le nombre de cellules donc la concentration (BENFORD et HUBBARD 1987).

La viabilité des cellules isolées est déterminée au moyen du test colorimétrique classique d'exclusion du bleu Trypan (en solution saline à 0,4 % Gibco ou 0,5 % Flow Laboratories). La membrane plasmique des hépatocytes exclue normalement le bleu Trypan de telle sorte que si les cellules sont colorées, elles sont considérées comme mortes car la coloration caractérise des lésions irréversibles de la membrane plasmique. Cette observation s'effectue au microscope optique à contraste de phase (Olympus BH 2).

La viabilité des hépatocytes notée S et exprimée en % est déterminée par le quotient suivant :

$$S = \frac{\text{nombre de cellules non colorées}}{\text{nombre total de cellules comptées}} \times 100$$

Comptage à l'hématimètre de Malassez :

Dans les cas où les expériences ont été pratiquées sur le modèle des hépatocytes de rat en suspension, le comptage est effectué à la cellule de Malassez. La concentration de la suspension exprimée en nombre de cellules par ml est calculée par la formule suivante :

$$C = \frac{N \cdot d \cdot 10^5}{n}$$

N = nombre total de cellules comptées
d = taux de dilution
n = nombre de champs comptés

Comptage à l'hématimètre de Neubauer :

Dans les cas où les expériences ont été pratiquées sur le modèle des hépatocytes en culture primaire, le comptage est effectué à la cellule de Neubauer. La concentration de la suspension exprimée en nombre de cellules viables par ml est calculée par la formule suivante :

$$C = \frac{A \cdot d \cdot D \cdot 10^4}{n}$$

A = nombre de cellules viables
d = dilution liée au bleu Trypan
D = dilution initiale de la suspension
n = nombre de champs comptés

332. DOSAGES ENZYMATIQUES.

Quand les membranes des hépatocytes sont altérées, certaines enzymes fuient à l'extérieur de la cellule. La fuite d'enzymes hydrosolubles comme la lactate déshydrogénase (LDH), la glutamate-pyruvate transaminase (GPT ou ALAT) ou encore la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT ou ASAT) peuvent être l'expression de la dégradation plus ou moins prononcée de la structure membranaire des hépatocytes. Les relargages de LDH ou de GPT dans le milieu de culture des hépatocytes sont reconnus pour être corrélés étroitement au test d'exclusion du bleu Trypan.

Les trois enzymes précitées (LDH, GPT et GOT) ont été choisies comme marqueurs quantitatifs des atteintes provoquées par les produits cytotoxiques sur les hépatocytes *in vitro*.

Les réactions biochimiques caractéristiques de chacune de ces enzymes sont :

- Lactate déshydrogénase (LDH), 100 % cytoplasmique



- Glutamate pyruvate transaminase (GPT) ou alanine aminotransférase (ALAT), 100 % cytoplasmique



- Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) ou aspartate aminotransférase (ASAT), 100 % cytoplasmique



3321. HEPATOCYTES EN SUSPENSION.

L'activité des enzymes LDH, GPT et GOT est mesurée au moyen des kits optimisés (LDH opt. 54039, GPT opt. 161071, GOT opt. 158178 Boehringer). Les lectures sont faites dans l'UV à 340 nm et 25 degrés C au spectrophotomètre (Uvikon 810, Kontron). On peut pratiquer 2 types de mesures soit :

- mesure de l'activité des enzymes libérées :

Prélever un aliquote de la suspension d'hépatocytes.

Centrifuger 2 minutes à 50 g (Centrifugeuse Jouan).

Prélever le surnageant et centrifuger une seconde fois 5 minutes à 1500 g.

Les surnageants peuvent être conservés plusieurs heures à 4 degrés C ou congelés à -20 degrés C.

- mesure de l'activité totale :

Prélever un aliquote de la suspension d'hépatocytes.

Lyser les cellules en ajoutant du Triton X 100 (Sigma) à raison de 0,5 % (v/v).

Vortexer et centrifuger 5 minutes à 1500 g.

Les surnageants peuvent être conservés plusieurs heures à 4 degrés C ou congelés à -20 degrés C.

Ceci permet d'exprimer les résultats en pourcentages de relargage suivant le quotient :

$$\frac{\text{activité libérée}}{\text{activité totale}} \times 100$$

3322. HEPATOCYTES EN CULTURE PRIMAIRE.

L'activité des enzymes LDH, GPT et GOT est mesurée au moyen des kits optimisés (LDH opt. 28.010.500, SGPT opt. 28.010.700, SGOT opt. 28.010.600 Baker Instruments). Les lectures sont faites dans l'UV à 340 nm et 25 degrés C au spectrophotomètre automatisé (Centrifichem System 400). Chaque série de dosages (25 échantillons par passage) est contrôlé avec un sérum test reconstitué (Percinorm^R U Boehringer). On peut pratiquer 2 types de mesures soit :

- mesure de l'activité des enzymes libérées :

Prélever dans les boites un aliquote du milieu de culture.

Centrifuger 2 minutes à 50 g à 4 degrés C (Centrifugeuse réfrigérée Beckman TJ-6 + TJ-R).

Prélever le surnageant et centrifuger une seconde fois 5 minutes à 1500 g à 4 degrés C.

Les surnageants peuvent être conservés plusieurs heures à 4 degrés C ou congelés à -20 degrés C.

- mesure de l'activité totale :

Détacher le tapis d'hépatocytes du fond des boites de cultures par "scappage" à l'aide d'un rubber policeman.

Prélever la suspension d'hépatocytes ainsi obtenue et ajouter un volume égal d'une solution (à 2 % dans l'eau distillée) de Triton X 100 (Sigma) afin de lyser les cellules.

Vortexer et centrifuger 5 minutes à 1500 g à 4 degrés C (Centrifugeuse réfrigérée Beckman TJ-6 + TJ-R).

Les surnageants peuvent être conservés plusieurs heures à 4 degrés C ou congelés à -20 degrés C.

Ceci permet d'exprimer les résultats en pourcentages de relargage suivant le quotient :

$$\frac{\text{activité libérée}}{\text{activité totale}} \times 100$$

333. DOSAGE DES PROTEINES TOTALES.

3331. METHODE DE COLORATION DE LOWRY.

Ce dosage colorimétrique est effectué selon LOWRY et al. (1951) modifié et adapté en microméthode au laboratoire.

- Préparation des échantillons :

Détacher le tapis d'hépatocytes du fond des boîtes de cultures par "scappage" à l'aide d'un rubber policeman.
Prélever la suspension d'hépatocytes ainsi obtenue et ajouter un volume égal d'une solution d'acide trichloracétique (Prolabo) dilué à 10 % dans l'eau distillée afin de lyser les cellules.
Vorteler et centrifuger 5 minutes à 1500 g à 4 degrés C (Centrifugeuse réfrigérée Beckman TJ-6 + TJ-R).
Laver 2 fois le culot par du NaCl 0,9 %.
Reprendre et remettre le culot en suspension dans 500 ul de NaCl à 0,9 %.

- Réactifs pour le dosage :

- solution A = dissoudre 2 g de Na_2CO_3 (Prolabo) dans 100 ml de NaOH 0,1 N (Prolabo).
- solution B = dissoudre 50 mg de CuSO_4 (Prolabo) et 100 mg de citrate trisodique (Fluka) dans 10 ml d'eau distillée.
- solution C = Mélanger 100 ml de A + 2 ml de B avant le dosage.
- solution D = Diluer le réactif de Folin-Clocalteu 2 N (Sigma) au demi dans l'eau distillée pour obtenir une solution molaire.

- Principe du dosage :

Répartir les prises d'essais des échantillons à tester dans des microtubes (Treff) sous un volume de 25 ou 50 ul et compléter à 100 ul avec de l'eau distillée.
Ajouter 1 ml de réactif C dans chaque tube.
Vortexer et laisser 10 minutes à température ambiante.
Ajouter 100 ul de réactif D dans chaque tube et laisser 1 heure à température ambiante.
Lire l'absorbance à 750 nm au spectrophotomètre (Uvikon 610 CL, Kontron).

La variation de densité optique (D.O) est linéaire en fonction de la quantité de protéines.

Une droite de régression donnant la concentration protéique en fonction de la DO est établie au moyen d'une gamme d'étalonnage construite par le dosage de quantités connues de sérum albumine bovine (Sigma).

A partir de l'équation de la droite de régression, la concentration en protéines totales présentées dans les échantillons testés peut être calculée.

3332. METHODE DE COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE.

- Réactifs pour le dosage :

Diluer la solution mère de bleu de Coomassie (Bio-rad protein assay, Biorad Laboratories GmbH) au cinquième dans l'eau distillée.

- Principe du dosage :

Vider les plaques de microculture par retournement.

Rincer 2 fois avec du tampon phosphate x1 (PBS Flow Laboratories ou Gibco).

Vider de nouveau et ajouter 50 ul de NaOH 0,2 N (Prolabo) dans chaque puit afin de provoquer la lyse des hépatocytes attachés au fond des puits.

Mettre les plaques à incuber pendant 15 minutes à 37 degrés C.

Répartir 200 ul de solution de bleu de Coomassie diluée dans chaque puit.

Agiter les plaques afin d'homogénéiser la coloration.

Laisser 30 minutes à température ambiante.

Lire l'absorbance en bichromatisme (DO à 620 nm - DO à 405 nm) au lecteur de plaques automatique (Molecular Devices UV Max relié à un micro-ordinateur portable IBM PC) contre un blanc constitué de 8 puits vides (colonne 1 de la plaque).

Une droite de régression donnant la concentration protéique en fonction de la DO est établie au moyen d'une gamme d'étalonnage construite par le dosage de quantités connues de sérum albumine bovine (Sigma).

A partir de l'équation de la droite de régression, la concentration en protéines totales présentent dans les échantillons testés peut être calculée.

Pour la comparaison des variations mesurées lors d'une même expérience, les résultats peuvent être présentés en DO.

334. TEST DE COLORATION AU ROUGE NEUTRE.

Ce test permet de mesurer la capacité des lysosomes à incorporer le colorant rouge neutre.

Le dosage est effectué suivant les indications fournies par le Professeur ADOLPHE du laboratoire de Pharmacologie Cellulaire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (PARIS).

- Réactifs pour le dosage :

Rouge neutre (Fluka).
Formaldéhyde à 40 % dans l'eau distillée.
Chlorure de calcium anhydre (Prolabo).
Acide acétique (Prolabo).
Ethanol à 50 % dans l'eau distillée.
Milieu de Williams incomplet (annexe 21).

- Préparation des solutions :

a) solution de rouge neutre

A partir d'une solution mère de rouge neutre à 0,4 % dans l'eau distillée, constituer une solution fille en la diluant au 1/80 dans du milieu de Williams incomplet.

Placer cette solution durant 24 heures à 37 degrés C.

Après ce temps (au moment du dosage), centrifuger cette solution fille durant 5 minutes à 1500 g (Centrifugeuse réfrigérée Beckman TJ-6 + TJ-R) et récupérer le surnageant.

b) solution de formol-calcium

Additionner 10 ml de formaldéhyde à 40 % + 10 ml de chlorure de calcium à 10 % + 80 ml d'eau distillée.

c) solution d'acide acétique-éthanol

Ajouter 1 ml d'acide acétique glacial à 99 ml d'éthanol à 50 % juste avant l'utilisation.

- Principe du dosage :

a) coloration

Vider les plaques de microculture par retournement.

Rincer les puits en distribuant dans chaque puit 100 ul de milieu de Williams incomplet.

Vider de nouveau les plaques de microculture par retournement.

Distribuer 100 ul de solution fille de rouge neutre dans tous les puits sauf dans ceux de la colonne 1 qui serviront de blanc.

Placer les plaques pendant 3 heures dans un incubateur pour culture de cellules (37 degrés C, 5 % CO₂ / 95 % air, humidité saturante).

b) Fixation et lyse des hépatocytes

Eliminer délicatement le milieu contenant le rouge neutre par retournement des plaques.

Distribuer dans chaque puit 100 ul de la solution de formol-calcium et vider la plaque en moins d'une minute sous une hotte ventilée!

Distribuer dans chaque puit 100 ul de la solution d'acide acétique-éthanol.

Agiter les plaques jusqu'à complète homogénéisation de la coloration.

Lire l'absorbance à 540 nm au lecteur de plaques automatique (Molecular Devices UV Max relié à un micro-ordinateur portable IBM PC) contre un blanc constitué de 8 puits n'ayant pas reçu de rouge neutre (colonne 1 de la plaque).

Les résultats sont exprimés en densités optiques (DO).

335. TEST DE COLORATION AU MTT.

Ce dosage exploite la capacité métabolique des mitochondries à pouvoir réduire les sels de tétrazolium hydrosolubles en formazans colorés en bleu et insolubles dans l'eau mais solubles dans le DMSO (SCUDIÉRO et al.1988).

- Réactifs pour le dosage :

Le (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényltétrazolium bromide) autrement abrégé MTT (Sigma).
Diméthylsulfoxyde DMSO (Merck)
Milieu de Williams incomplet (annexe 21).

- Préparation des solutions :

A partir d'une solution mère de MTT à 5 mg/ml dans le milieu de Williams incomplet conservée à 4 degrés C à l'abri de la lumière, constituer une solution fille diluée au 1/10 dans le milieu de Williams incomplet et la mettre au bain marie à 37 degrés C au moment du dosage.

- Principe du dosage :

Vider délicatement les puits de la plaque de microculture et distribuer 100 ul de la solution fille de MTT dans chaque puit (réaliser cette opération en lumière atténuée).

Placer les plaques pendant 2 heures dans un incubateur pour culture de cellules (37 degrés C, 5 % CO₂ / 95 % air, humidité saturante).

Vider de nouveau les plaques et laisser sécher quelques instants.

Solubiliser les cristaux de formazan formés en distribuant 200 ul de DMSO dans chaque puit et agiter soit à la pipette multicanaux soit avec un agitateur de plaques.

Lire l'absorbance à 570 nm au lecteur de plaques automatique (Molecular Devices UV Max relié à un micro-ordinateur portable IBM PC) contre un blanc constitué de 8 puits vides sans cellules (colonne 1 de la plaque).

Les résultats sont exprimés en densités optiques (DO).

336. DOSAGE DE L'ALBUMINE.

Afin de pouvoir apprécier les capacités métaboliques des hépatocytes en culture primaire, la quantification de la synthèse d'albumine sécrétée par les cellules représente un bon marqueur (GUILLOUZO 1986).

Ce dosage par une méthode radio-immunologique en phase liquide a été mis au point de novo dans la section d'Immunotoxicologie du service de Toxicologie du Centre SANOFI Recherches à Montpellier par B. BASUYAUX et son équipe. Il a été mis au point pour quantifier soit l'albumine de rat, soit l'albumine humaine.

3361. DOSAGE DE L'ALBUMINE DE RAT.

L'objectif est de doser, de manière spécifique, dans les surnageants des cultures primaires d'hépatocytes de rat, une protéine plasmatique synthétisée essentiellement au niveau hépatique : l'albumine. En effet, la capacité de synthèse de l'albumine, appréciable par la mesure du taux d'albumine relarguée dans les milieux de culture des hépatocytes, est intimement liée à l'intégrité de ces cellules.

La présence d'une grande quantité de protéines différentes et en particulier d'albumine sérique bovine, liée à la supplémentation des milieux de culture en sérum de veau nouveau né ou foetal (annexe 2), nécessite d'avoir recours à un dosage immunologique spécifique pour doser l'albumine sérique de rat.

La quantification de l'albumine de rat est réalisée par dosage radio-immunologique en phase liquide (identification simple, précise, sensible et spécifique), à l'aide d'albumine de rat (France Biochem 1267-22) radiomarquée à l'iode 125 (NEN) et d'un anticorps polyclonal de mouton anti-albumine sérique de rat (Touzart et Matignon B 1261).

a) Radiomarquage de l'albumine sérique de rat.

a1) Préparation des solutions réactionnelles.

- Tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5 :
Dissoudre 2,16 g de KH_2PO_4 et 30,08 g de Na_2HPO_4 , 12 H_2O dans un volume final de 1000 ml d'eau distillée.
- Solution de chloramine T :
Peser 10 mg de Chloramine T en solution à 0,33 mg/ml (Merck 2426) et dissoudre dans 30 ml de tampon phosphate 0,1 M.
- Solution de métabisulfite :
Peser 10 mg de Métabisulfite de sodium en solution à 1 mg/ml (Merck 6528) et dissoudre dans 10 ml de tampon phosphate 0,1 M.
- Tampon phosphate-gélatine :
Peser 0,5 g de gélatine (Merck 4078) et dissoudre dans 100 ml de tampon phosphate 0,1 M.
- Faire une solution d'albumine de rat à 1 mg/ml de tampon phosphate 0,1 M.

a2) Radiomarquage.

Dans une petite fiole conique contenant 37 MBq (1 mCi) d'iode 125 (NaI¹²⁵I) sous un volume de 10 ul, ajouter successivement :

- 50 ul de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5.
- 20 ul de la solution d'albumine sérique de rat.
- 30 ul de la solution de chloramine T.

Agiter au Vortex pendant 1 minute à température ambiante.

Ajouter 50 ul de la solution de métabisulfite de sodium pour stopper la réaction puis ajouter 100 ul de la solution de tampon phosphate gélatine.

a3) Purification de l'albumine radiomarquée.

- Sur une colonne PD 10 (gel G25 pour filtration sur gel, Pharmacia) prête à l'emploi, préalablement équilibrée avec 30 ml de tampon phosphate-gélatine puis rincée avec 30 ml de tampon phosphate, ajouter les 260 ul de milieu réactionnel de radiomarquage de l'albumine.

- Eluer l'albumine radiomarquée en versant sur la colonne 12 ml de tampon phosphate et récupérer l'éluat (10 gouttes par tube) dans 24 tubes à hémolyse en polystyrène de 5 ml contenant déjà 1 ml de tampon phosphate-gélatine.

- Prélever 10 ul dans chaque tube à l'aide d'un embout jaune (Gilson) et compter la radioactivité des embouts au compteur gamma (LKB 1272) afin de repérer le pic d'albumine radiomarquée et le pic d'iode 125.

- Récupérer le pic correspondant à l'albumine radiomarquée.

- Mesurer son volume et sa radioactivité (effectuer une dilution au 1/10 = 10 ul du pool + 90 ul de tampon phosphate-gélatine) et compter la radioactivité de 4 prélèvements de 10 ul avec les embouts au compteur gamma (LKB 1272).

La valeur mesurée est la radioactivité du pool par ul.

a4) Conservation de l'albumine radiomarquée.

- Diluer le pool dans le tampon phosphate-gélatine de manière à avoir environ 25 000 cpm/ul.

- Aliquoter le pool par fractions de 200 ul et conserver les aliquots à -20 degrés C.

b) Dosage radio-immunologique en phase liquide.

b1) Principe.

Le dosage par déplacement (ou compétition) est réalisé en présence d'une quantité limitante en anticorps. Le radio-immunos dosage est mis en oeuvre selon une méthode RIA (Radio Immuno Assay), basée sur la compétition pour l'occupation des sites de liaison des anticorps anti-albumine sérique de rat en solution, entre la forme naturelle (froide = non radiomarquée) de l'albumine à doser et le traceur constitué de ce même antigène associé à une sonde radioactive (l'iode 125). Lorsque la quantité d'albumine introduite augmente, la quantité de traceurs radioactifs liés diminue.

b2) Les réactifs.

- L'anticorps :

Immunoglobulines G polyclonales de mouton anti-albumine sérique de rat (Touzart et Matignon B 1261). Les anticorps USB sont achetés purifiés par une étape de précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une étape de chromatographie échangeuse d'ions.

- L'albumine sérique de rat de pureté supérieure à 97 % (France Biochem 1267-22).

- Les tampons :

"Tampon PB" = tampon phosphate 0,05 M à pH 7,5 :

Dissoudre 15,04 g de Na_2HPO_4 , 12 H_2O + 1,08 g de KH_2PO_4 + 1g de NaN_3 dans un volume final de 1000 ml d'eau distillée.

"Tampon PB gélatine" :

Dissoudre 0,5 g de gélatine (Merck 4078) dans 100 ml de tampon PB.

"Tampon PB/BGG" :

Dissoudre 10 g de gamma globulines bovines (Sigma G-3500) dans 100 ml de tampon PB.

"Tampon PB/PEG" :

Dissoudre 200 g de polyéthylène glycol (Merck 807491) dans 1 litre de tampon PB.

b3) Protocole.

Dans un tube à hémolyse en PVC de 5 ml (ou dans un tube en polypropylène de 3 ml) introduire les éléments suivants :

- 100 ul d'albumine en solution dans le tampon "PB gélatine" ou 100 ul de milieu de culture des hépatocytes (prélevé au temps T) et dilué au moins au 1/100 ou 100 ul de tampon "PB gélatine" (bruit de fond).

- 100 ul d'albumine radiomarquée à l'iode 125 (environ 10 000 cpm pour 100 ul).

- 100 ul d'anticorps en solution à 60 ng/ml dans le tampon "PB gélatine" ou 100 ul de tampon "PB gélatine" (bruit de fond).

Agiter les tubes au Vortex et incuber soit 3 heures à 37 degrés C soit 18 heures à 4 degrés C.

Précipiter les immunocomplexes en ajoutant dans chaque tube :

- 100 ul de tampon "PB/BGG".

- 1 ml de tampon "PB/PEG".

Agiter les tubes au Vortex et les centrifuger à 4 degrés C durant 30 minutes à 3000 RPM (Centrifugeuse réfrigérée Beckman TJ-6 + TJ-R) ou 15 minutes à 4000 RPM (Centrifugeuse réfrigérée Heraeus Minifuge 2).

Eliminer les surnageants par retournement des tubes et mesurer au compteur gamma (LKB 1272) la radioactivité des culots.

La représentation logit/log permet de linéariser les résultats comme cela se pratique dans tous les dosages par déplacement. La sensibilité du dosage est exprimée en dose d'albumine sérique de rat qui diminue le signal de 10 %.

Les résultats obtenus pour la mise au point de ce dosage de l'albumine sérique de rat sont consignés dans l'annexe 4.

3362. DOSAGE DE L'ALBUMINE HUMAINE.

La quantification de l'albumine humaine est réalisée par dosage radio-immunologique en phase liquide (identification simple, précise, sensible et spécifique), à l'aide d'albumine humaine (France Biochem 126-654) radiomarquée à l'iode 125 (NEN) et d'un anticorps polyclonal de chèvre anti-albumine sérique humaine (Interchim).

a) Radiomarquage de l'albumine sérique humaine.

a1) Préparation des solutions réactionnelles.

Les solutions réactionnelles qui sont nécessaires pour la réalisation du dosage de l'albumine sérique humaine sont identiques à celles employées dans le cas de l'albumine sérique de rat. Se reporter au paragraphe 3361 a1.

a2) Radiomarquage.

La procédure opératoire est identique à celle décrite dans le cas du radiomarquage de l'albumine de rat. Se reporter au paragraphe 3361 a2.

a3) Purification de l'albumine radiomarquée.

La procédure opératoire est identique à celle décrite dans le cas de la purification de l'albumine de rat radiomarquée. Se reporter au paragraphe 3361 a3.

a4) Conservation de l'albumine radiomarquée.

Comme dans le cas de l'albumine de rat, les aliquotes d'albumine humaine radiomarquée sont conservés à -20 degrés C.

b) Dosage radio-immunologique en phase liquide.

b1) Principe.

Le dosage s'effectue comme dans le cas de l'albumine sérique de rat, par déplacement (ou compétition) selon une méthode radio-immunologique (RIA ou Radio Immuno Assay) et entraîne à formuler les mêmes remarques que celles consignées au paragraphe 3361 b1.

b2) Les réactifs.

- L'anticorps :
Immunoglobulines G polyclonales de chèvre anti-albumine sérique humaine (Interchim). Les anticorps sont achetés immunopurifiés.
- L'albumine sérique humaine (France Biochem 126-654).
- Les tampons :
La préparation des "Tampon PB", "Tampon PB gélatine", "Tampon PB/BGG" et "Tampon PB/PEG" est identique à celle décrite pour l'albumine sérique de rat au paragraphe 3361 b2.

b3) Protocole.

Le protocole est identique à celui décrit dans le cas de l'albumine de rat radiomarquée. Se reporter au paragraphe 3361 b3.

Les résultats obtenus pour la mise au point de ce dosage de l'albumine sérique humaine sont consignés dans l'annexe 5.

34. OBSERVATIONS CYTOMORPHOLOGIQUES.

341. MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

L'observation directe des hépatocytes de rat, mis en suspension après la perfusion par la collagénase (paragraphe 32) est réalisée lors de l'évaluation de la viabilité de la préparation avec coloration au bleu Trypan (paragraphe 331). La réfringence, la rotondité, la formation éventuelle de protrusions (bulles) qui peuvent s'observer à la surface des hépatocytes, sont autant de facteurs supplémentaires qui permettent d'apprécier la qualité des cellules et ainsi qui viennent compléter le comptage des hépatocytes colorés ou non par le bleu Trypan. Cette observation cytomorphologique est réalisée au microscope optique à contraste de phase au grossissement x 400 (Microscope Olympus BH 2).

L'observation des boîtes de culture des hépatocytes en culture primaire (paragraphe 322) peut s'effectuer directement au moyen d'un microscope inversé à contraste de phase (Olympus IM). La qualité des cultures tient compte de l'attachement des hépatocytes au support, de l'étalement des dits hépatocytes, de la densité du tapis cellulaire formé et du nombre de cellules en suspension. Les signes de cytotoxicité tels que les altérations de la membrane plasmique, la présence de vacuoles lipidiques ou vacuoles de lyse, de granulations intra-cytoplasmiques réfringentes ou opaques, constituent autant de critères qui traduisent les atteintes de l'intégrité des hépatocytes.

Afin de quantifier de façon simple l'éventuelle cytotoxicité d'un produit testé dans les modèles d'hépatocytes en culture, nous avons établi le codage arbitraire en notation d'abondance suivant :

- 0 = tapis cellulaire correct (aucun signe de cytotoxicité).
- + = tapis cellulaire correct mais présence d'inclusions intra-cytoplasmiques (légère cytotoxicité).
- ++ = nombreuses cellules étalées, rétraction hépatocytaire, présence non négligeable d'hépatocytes en nécrose soit encore attachés au support soit en suspension dans le milieu de culture (cytotoxicité intermédiaire).
- +++ = rares hépatocytes encore attachés au support ou tous en suspension dans le milieu de culture, quasi totalité des hépatocytes nécrosés et morts (cytotoxicité forte).

342. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

3421. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.

a) Préparation des échantillons d'hépatocytes.

Centrifuger les hépatocytes en suspension à 50 g durant 2 minutes (Centrifugeuse Jouant).
Eliminer le surnageant par aspiration à la pipette.

- Fixation :

Fixer le culot cellulaire par le glutaraldéhyde en solution à 2,5 % dans du tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4) pendant 1 heure à 4 degrés C.

- Lavage :

Laver les échantillons durant 5 minutes par du tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4).

- Deshydratation :

Cette étape se déroule en plusieurs temps au court desquels les hépatocytes sont traités par de l'alcool éthylique (Prolabo) dilué dans de l'eau distillée à différents mouillages.

Alcool 30 % durant 5 minutes.

Alcool 50 % durant 5 minutes.

Alcool 70 % durant 5 minutes.

Alcool 95 % durant 5 minutes, 2 fois.

Alcool 100 % durant 10 minutes, 3 fois.

Oxyde de propylène durant 10 minutes, 2 fois.

Laisser sécher à l'air et à l'abri de la lumière.

- Montage :

Les cellules sont montées sur un support en aluminium garni de "scotch double face".

Vider les échantillons sous loupe binoculaire et constituer un tapis uniforme d'hépatocytes déséchés adhérents au "scotch double face".

Laisser les préparations désécher sous silicagel.

- Métallisation :

Double projection d'or sous vide.

Après cette dernière étape, les échantillons peuvent être conservés à l'abri de la poussière.

b) Observation des échantillons d'hépatocytes.

L'observation des hépatocytes ainsi préparés a été effectuée par J.M. KELLER (Ingénieur C.N.R.S.) et P. LEHR (Directeur de Recherche C.N.R.S.) au microscope électronique à balayage (MEB) Cambridge Stereoscam 250 à une tension de 20 Kvolts dans le laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement, Faculté des Sciences, Université de Nancy I (Responsable : Professeur M. DAUCA).

3422. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION.

Les étapes essentielles de la préparation des échantillons s'effectuent selon la méthode classique utilisée dans la section d'Anatomopathologie du service de Toxicologie du Centre de Recherches SANOFI à Montpellier.

- Fixation par le glutaraldéhyde en solution à 2,5 % dans du tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4).

- Post-fixation par le tétroxyde d'osmium en solution à 1 % dans le tampon cacodylate.

- Déshydratation classique par l'alcool éthylique dilué dans l'eau distillée à différents mouillages croissants.

- Inclusion dans l'épon.

- Coupes ultrafines à l'ultramicrotome Reichert.

- Coloration selon la technique de Reynolds (1963).

- Observation des coupes au microscope électronique à transmission Jeol EM 100 S.

35. ANALYSES STATISTIQUES DES RESULTATS.

Le traitement statistique des données mesurées est effectué en utilisant des méthodes dites paramétriques sous l'hypothèse de la normalité de la distribution des paramètres. Les séries sont considérées comme indépendantes car les fractions aliquotes d'hépatocytes en suspension traités ou les boîtes de culture contenant les hépatocytes sont assimilés à des lots différents non appariés.

Différents test statistiques sont appliqués aux valeurs mesurées en suivant la démarche présentée ci-dessous :

Test d'homogénéité des variances

COCHRAN
BARTLETT
LEVENE

Variances homogènes

Variances hétérogènes

ANALYSE DE VARIANCE

COMPARAISON DES VARIANCES
2 à 2

non
significative

significative

homogènes

non
homogènes

STOP

t de STUDENT EXACT

t de STUDENT

WELCH

nombre de comparaisons
supérieur à 6

non

oui

BONFERRONI

SCHEFFE

Dans le cas de l'analyse statistique des plans factoriels complets on utilise une régression multiple et le test F de FISCHER. L'étude des interactions ainsi que la modélisation mathématique sont effectuées selon les indications de VAILLANT (communication personnelle).

Pour réaliser ces différents tests statistiques, nous avons utilisé différentes sources bibliographiques (SCHWARTZ 1963, LELLOUCHE et LAZAR 19.., CEA 1978, FRONTIER 1981, CETAMA 1986) et plusieurs cours suivis durant nos études universitaires.

Pour la réalisation pratique de ces tests, l'usage de traitements informatiques à été indispensable soit sur micro-ordinateur (Apple II C, Apple II E, Amstrad PC 1512) soit sur mini-ordinateur (VAX 11/750 Digital).

4. RESULTATS.

Le tétrachlorure de carbone (CCl₄) et la D-galactosamine ont été choisis comme produits toxiques de référence afin de provoquer une atteinte membranaire des hépatocytes. Le but subséquent était de pouvoir ensuite utiliser ces molécules toxiques pour rechercher les éventuelles activités hépatotropes de 2 extraits aqueux bruts d'*Eupatorium cannabinum* L. et ainsi, à partir d'un exemple type, de pouvoir proposer des modèles *in vitro* adaptés au criblage précoce de substances naturelles.

Dans un premier temps, il a été nécessaire de déterminer dans quelles conditions la toxicité de ces produits de référence s'exprimerait sur les hépatocytes dans nos conditions expérimentales de culture.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché si les extraits de plante pouvaient présenter une cytotoxicité.

Enfin, la recherche d'un éventuel effet hépatotrope de ces extraits d'Eupatoire a été approchée.

41. CYTOTOXICITE DE 2 PRODUITS DE REFERENCE : LE TETRACHLORURE DE CARBONE ET LA D-GALACTOSAMINE.

411. HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION.

Les hépatocytes de rat sont isolés comme décrit au paragraphe 3211.

4111. EFFET/DOSE DU CCl₄ DURANT 30 MINUTES.

La cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 3212 avec les conditions A et B.

Après un temps de traitement de 30 minutes, la mesure de l'activité des enzymes libérées LDH, GPT et GOT est évaluée comme décrit au paragraphe 3321.

Les conditions du test sont les suivantes :

CCl ₄ mM	0	2	4	8	16	32
DMSO 5%	+	+	+	+	+	+
DMSO 1%	+	-	-	+	+	-

Les résultats présentés figures 4, 5, 6 et tableau II montrent une bonne corrélation si l'on compare les réponses obtenues avec les trois enzymes.

Lorsqu'il est ajouté aux suspensions cellulaires sous un volume de 5%, le CCl₄ provoque une fuite enzymatique modérée à la concentration de 2 mM (moins de 50% de l'activité enzymatique totale) et un effet maximal est obtenu à partir de la concentration de 8 mM; dose à laquelle la viabilité cellulaire est quasi nulle. Le DMSO 5% entraîne une légère augmentation du relargage des enzymes comparé au lot témoin.

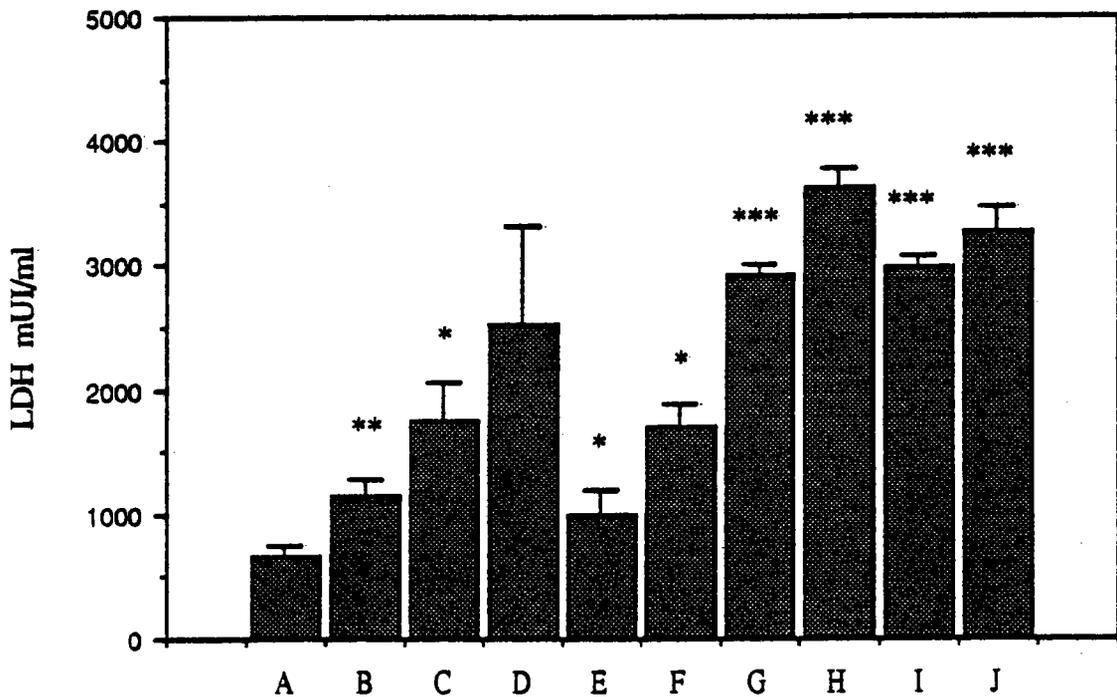
Lorsqu'il est ajouté aux suspensions cellulaires sous un volume de 1%, le CCl₄ provoque une fuite enzymatique modérée à la concentration de 8 mM (environ 50% de l'activité enzymatique totale) et une fuite enzymatique un peu plus importante à la concentration de 16 mM. Le DMSO 1% entraîne une légère augmentation du relargage des enzymes comparé au lot témoin.

Cependant, il faut noter que lorsque le toxique est ajouté aux suspensions cellulaires sous un volume de 1%, les résultats sont plus dispersés que dans le cas où il est ajouté sous un volume de 5%.

La photo 1 montre l'image d'un hépatocyte témoin en suspension présentant une surface externe intacte avec présence de microvillosités fines et caractéristiques d'une bonne qualité de la cellule.

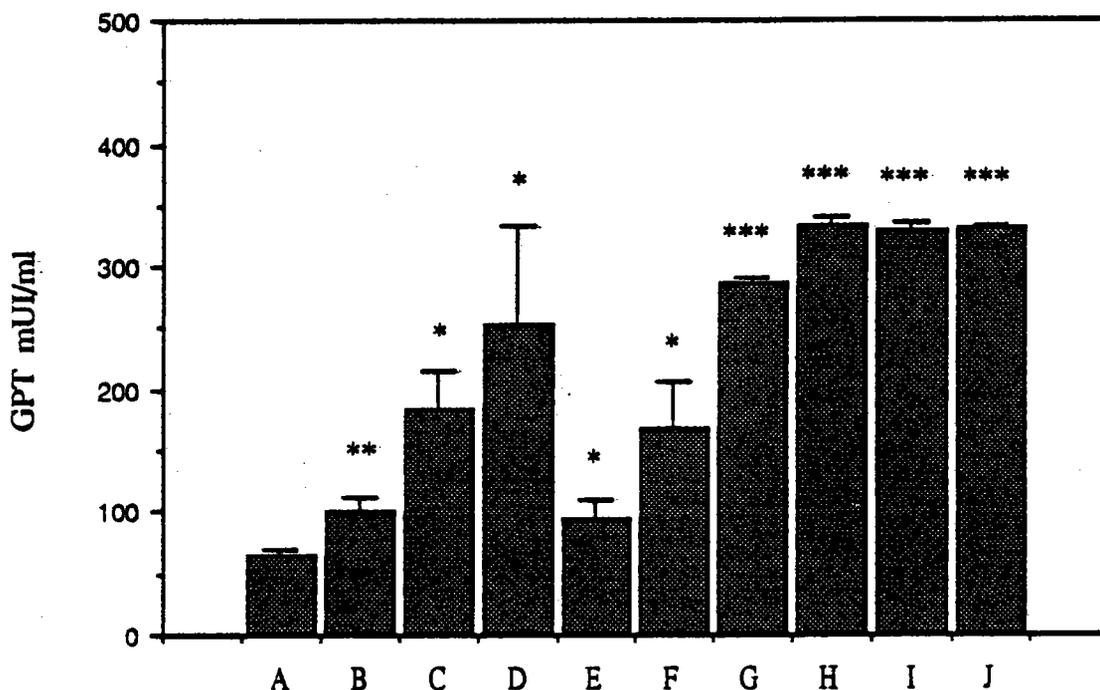
La photo 2 montre un hépatocyte de rat en suspension traité par le DMSO 5% durant 30 minutes. L'hépatocyte présente des protrusions (bulles) bien visibles au niveau de la surface externe de la membrane plasmique, ce qui traduit une atteinte non négligeable de la structure membranaire. Les microvillosités sont beaucoup moins fines que sur l'hépatocyte témoin.

La photo 3 montre un hépatocyte de rat en suspension traité par le CCl₄ 4 mM durant 30 minutes. L'hépatocyte ne présente plus de villosités à la surface externe de la membrane plasmique mais une surface quasiment lisse ce qui traduit une atteinte très importante de la structure de la membrane d'une cellule moribonde.



A = TEMOIN
B = DMSO 1%
C = CCl4 8 mM dans DMSO 1%
D = CCl4 16 mM dans DMSO 1%
E = DMSO 5%
F = CCl4 2 mM dans DMSO 5%
G = CCl4 4 mM dans DMSO 5%
H = CCl4 8 mM dans DMSO 5%
I = CCl4 16 mM dans DMSO 5%
J = CCl4 32 mM dans DMSO 5%

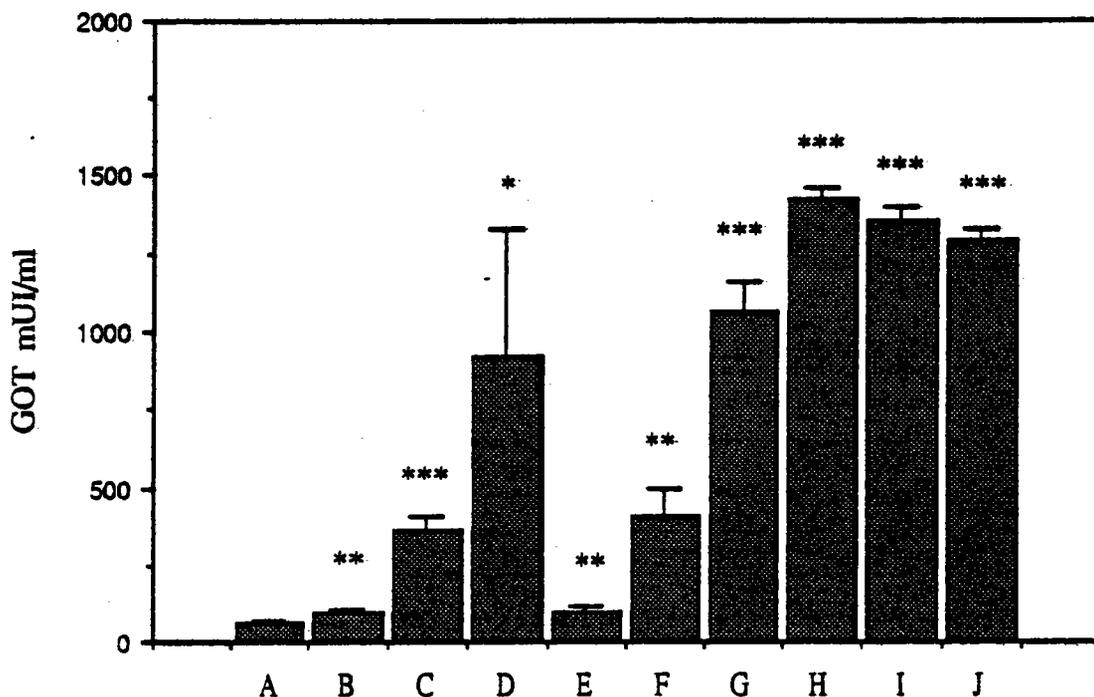
Figure 4 : EFFET DU CCL4 SUR LA FUITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.
Le CCl4 est solubilisé dans le DMSO et ajouté aux hépatocytes sous un volume de 1% ou 5%.
Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml + écart type (n=3).
Comparaison des moyennes par le test t de Student (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).



A = TEMOIN
B = DMSO 1%
C = CCl4 8 mM dans DMSO 1%
D = CCl4 16 mM dans DMSO 1%
E = DMSO 5%
F = CCl4 2 mM dans DMSO 5%
G = CCl4 4 mM dans DMSO 5%
H = CCl4 8 mM dans DMSO 5%
I = CCl4 16 mM dans DMSO 5%
J = CCl4 32 mM dans DMSO 5%

Figure 5 : EFFET DU CCL4 SUR LA FUITE DE L'ENZYME GPT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.

Le CCl4 est solubilisé dans le DMSO et ajouté aux hépatocytes sous un volume de 1% ou 5%.
Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml + écart type (n=3).
Comparaison des moyennes par le test t de Student (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).



A = TEMOIN
B = DMSO 1%
C = CCl4 8 mM dans DMSO 1%
D = CCl4 16 mM dans DMSO 1%
E = DMSO 5%
F = CCl4 2 mM dans DMSO 5%
G = CCl4 4 mM dans DMSO 5%
H = CCl4 8 mM dans DMSO 5%
I = CCl4 16 mM dans DMSO 5%
J = CCl4 32 mM dans DMSO 5%

Figure 6 : EFFET DU CCL4 SUR LA FUITE DE L'ENZYME GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.

Le CCl4 est solubilisé dans le DMSO et ajouté aux hépatocytes sous un volume de 1% ou 5%. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml + écart type (n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).

Tableau II : EFFET DU CCL4 SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.

Le CCL4 est solubilisé dans le DMSO et ajouté aux hépatocytes sous un volume de 1% ou 5%.

Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml ± écart type (n=3).

Comparaison des moyennes par le test t de Student (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).

PRODUIT	LDH	GPT	GOT
TEMOIN	673 ± 69	64 ± 6	65 ± 6
DMSO 1 %	1143 ± 150 **	101 ± 12 **	99 ± 11 **
CCL4 8 mM	1752 ± 310 *	184 ± 31 *	359 ± 48 ***
CCL4 32 mM	2513 ± 815	253 ± 82 *	920 ± 408 *
DMSO 5 %	1003 ± 185 *	94 ± 16 *	101 ± 14 **
CCL4 2 mM	1703 ± 185 *	169 ± 37 *	410 ± 85 **
CCL4 4 mM	2930 ± 86 ***	286 ± 5 ***	1065 ± 96 ***
CCL4 8 mM	3639 ± 151***	335 ± 5 ***	1421 ± 40 ***
CCL4 16 mM	2984 ± 99 ***	329 ± 8 ***	1356 ± 42 ***
CCL4 32 mM	3272 ± 212***	332 ± 3 ***	1290 ± 39 ***

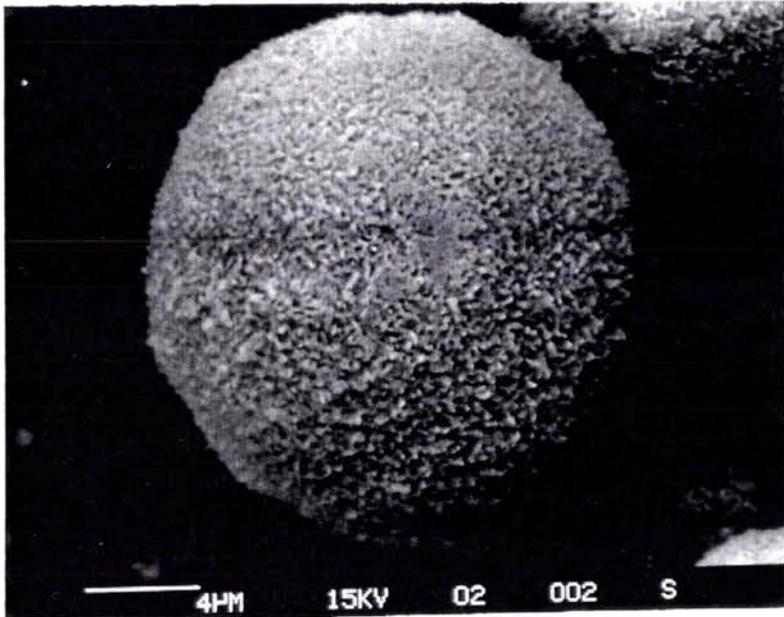


PHOTO 1 : HEPATOCYTE DE RAT EN SUSPENSION - TEMOIN 30 MINUTES

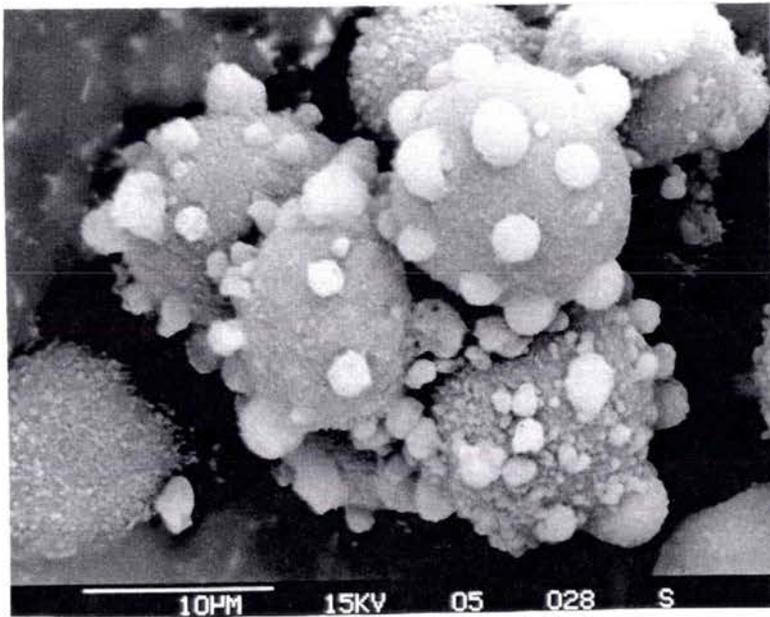


PHOTO 2 : HEPATOCYTE DE RAT EN SUSPENSION - DMSO 5 % 30 MINUTES

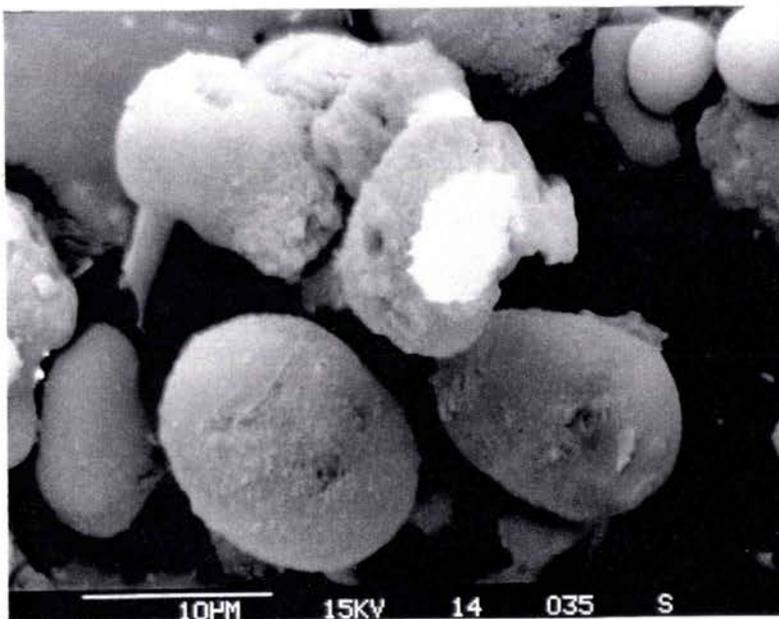


PHOTO 3 : HEPATOCYTE DE RAT EN SUSPENSION - CCL4 4 mM 30 MINUTES

4112. CINÉTIQUE D'ACTION TOXIQUE DU CCl₄ 8 mM.

La cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 3212 avec les conditions B.

Aux temps correspondants, la mesure de l'activité des enzymes libérées LDH, GPT et GOT est évaluée comme décrit au paragraphe 3321.

Les résultats présentés figures 7, 8, 9 et tableau III montrent que le CCl₄ 8 mM augmente significativement la fuite des enzymes mesurées dès la 5^{ème} minute après le début du traitement comparé au lot témoin pris au temps 0.

L'activité de la GPT libérée se stabilise ensuite jusqu'au temps 120 minutes alors que la LDH et la GOT continuent à augmenter régulièrement jusqu'au temps 90 minutes. Une petite baisse du relargage de LDH et GPT est observée entre la 90^{ème} et la 120^{ème} minute, ceci étant plus marqué avec la GOT.

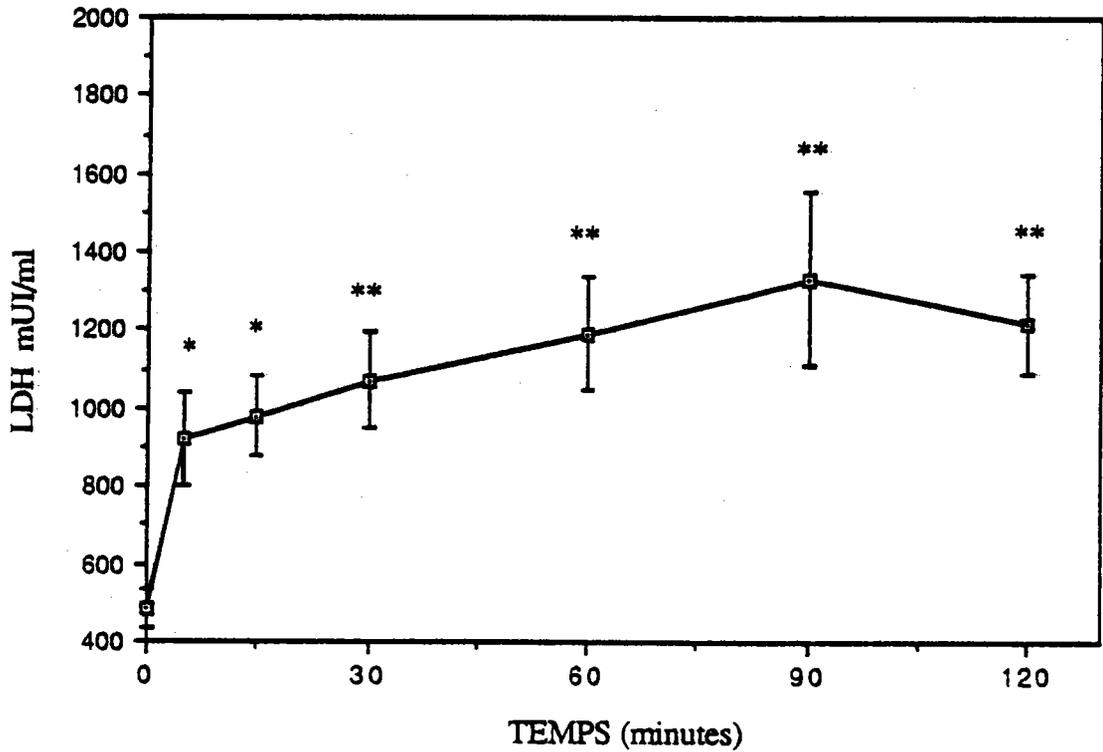


Figure 7 : EFFET DU CCL4 8 mM SUR LA FUITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 120 MINUTES.

Le CCl₄ est solubilisé dans le DMSO et ajouté aux hépatocytes sous un volume de 1%. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml \pm écart type (n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student (* p < 0,05; ** p < 0,01).

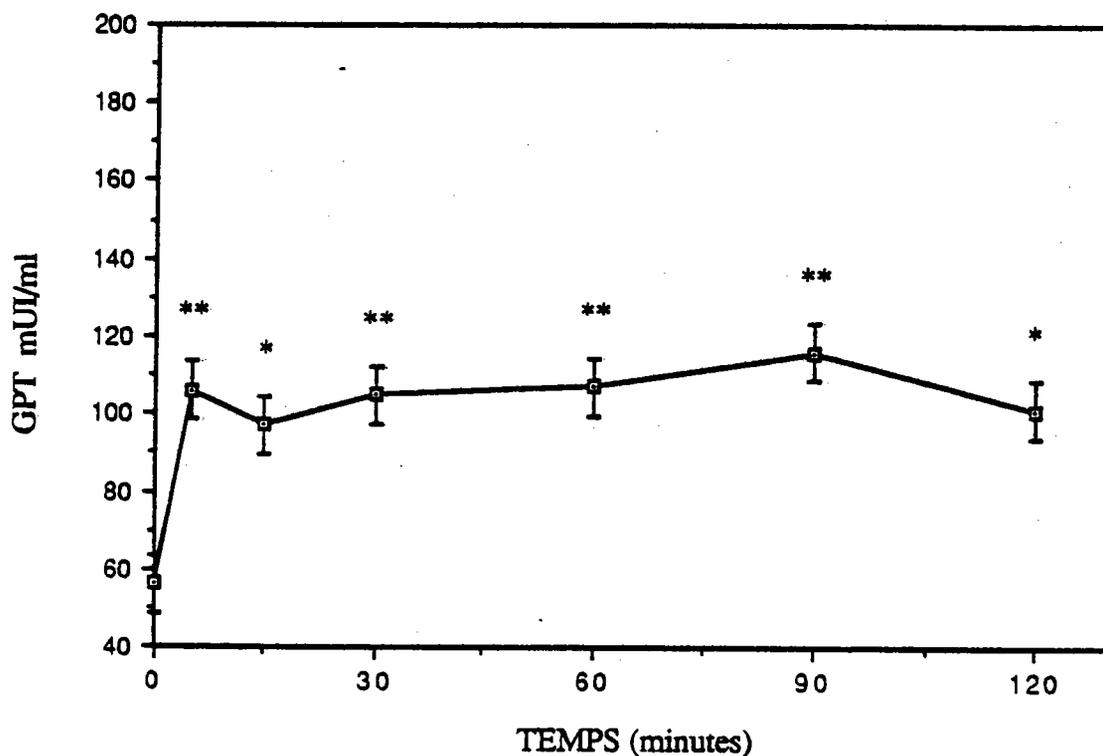


Figure 8 : EFFET DU CCL4 8 mM SUR LA FUIITE DE L'ENZYME GPT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 120 MINUTES.

Le CCl4 est solubilisé dans le DMSO et ajouté aux hépatocytes sous un volume de 1%. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml ± écart type (n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student (* p < 0,05; ** p < 0,01).

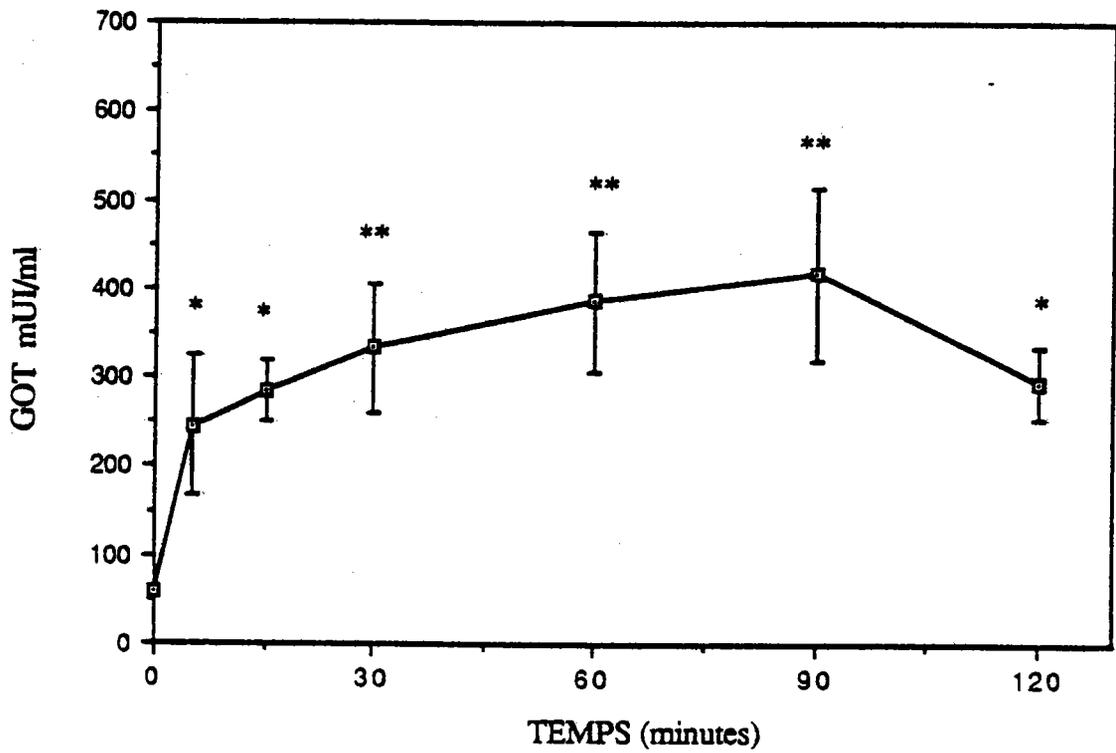


Figure 9 : EFFET DU CCL4 8 mM SUR LA FUITE DE L'ENZYME GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 120 MINUTES.

Le CCl4 est solubilisé dans le DMSO et ajouté aux hépatocytes sous un volume de 1%. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml ± écart type (n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student (* p < 0,05; ** p < 0,01).

Tableau III : EFFET DU CCL4 8 mM SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 120 MINUTES.

Le CCl4 est solubilisé dans le DMSO et ajouté aux hépatocytes sous un volume de 1%. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml ± écart type (n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student (* p < 0,05; ** p < 0,01).

PRODUIT	TEMPS	LDH	GPT	GOT
DMSO 1%	0 min	486 ± 50	56 ± 3	59 ± 5
CCL4 8 mM	5 min	920 ± 118 *	106 ± 14**	246 ± 79 *
CCL4 8 mM	15 min	981 ± 104 *	97 ± 12 *	286 ± 34 *
CCL4 8 mM	30 min	1072 ± 123**	105 ± 13**	334 ± 73**
CCL4 8 mM	60 min	1191 ± 146**	107 ± 14**	387 ± 79**
CCL4 8 mM	90 min	1333 ± 223**	116 ± 18**	417 ± 97**
CCL4 8 mM	120 min	1218 ± 127**	101 ± 6 *	294 ± 41 *

4113. INTERACTIONS ENTRE LE CCl4 ET 2 TIERS SOLVANTS.

La cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 3212 avec les conditions A et B.

Après un temps de traitement de 30 minutes, la mesure de l'activité des enzymes libérées LDH, GPT et GOT est évaluée comme décrit au paragraphe 3321.

Pour cette série d'expériences, les protocoles sont construits selon la technique mathématique des Plans Factoriels Complets suivant les indications de VAILLANT (communication personnelle).

On considère que le solvant correspond à la variable X1 et que le CCl4 correspond à la variable X2.

Le solvant est testé à 3 concentrations : 1 %, 3 % et 5 % qui représentent donc 3 modalités codées respectivement -1, 0 et +1. Le CCl4 est testé à 4 concentrations : 0, 2, 4 et 6 mM qui représentent donc 4 modalités codées respectivement -3, -1, +1 et +3.

Le codage est un simple changement de variable qui représente le demi-intervalle de variation.

Il est alors possible de dresser le tableau suivant qui va représenter sous une forme codée l'ensemble des conditions pratiquées dans ces expériences.

solvant. X1	CCl4 X2	Signification
-1	-3	Solvant 1 % et CCl4 0 mM
-1	-1	Solvant 1 % et CCl4 2 mM
-1	+1	Solvant 1 % et CCl4 4 mM
-1	+3	Solvant 1 % et CCl4 6 mM
0	-3	Solvant 3 % et CCl4 0 mM
0	-1	Solvant 3 % et CCl4 2 mM
0	+1	Solvant 3 % et CCl4 4 mM
0	+3	Solvant 3 % et CCl4 6 mM
+1	-3	Solvant 5 % et CCl4 0 mM
+1	-1	Solvant 5 % et CCl4 2 mM
+1	+1	Solvant 5 % et CCl4 4 mM
+1	+3	Solvant 5 % et CCl4 6 mM

Le traitement statistique des données est réalisé au moyen d'une régression multiple.

41131. INTERACTIONS ENTRE LE CCl4 ET L'ETHANOL.

Les résultats sont présentés sous forme graphique dans les figures 10, 11, 12 et l'ensemble des valeurs numériques mesurées est présenté tableau IV.

Le modèle polynomial obtenu à partir de l'analyse de la régression multiple permet d'établir les équations générales suivantes pour les relargages de chaque enzyme testées :

l'équation générale (1) pour la LDH

$$1407 + 195 X_2 + 186 X_1 X_2 + 394 X_1 + 63 X_1 (X_2^2 - 5) + 36 (X_2^2 - 5) + 71 (X_1^2 - 0,7) (X_2^2 - 5)$$

l'équation générale (2) pour la GPT

$$131,7 + 17,7 X_2 + 15,8 X_1 X_2 + 31,8 X_1 + 5,5 X_1 (X_2^2 - 5) + 3,5 (X_2^2 - 5) + 6,2 (X_1^2 - 0,7) (X_2^2 - 5)$$

l'équation générale (3) pour la GOT

$$193,7 + 39,6 X_2$$

Pour les 2 enzymes LDH et GPT, d'après l'analyse des équations du modèle calculé selon la régression multiple associée à l'interprétation plus parlante des représentations graphiques il apparaît qu'il existe une synergie très nette entre les variables X_1 et X_2 en particulier pour la concentration en CCl4 la plus élevée. Les équations du modèle soulignent la synergie entre X_1 et X_2 qui s'exprime par la significativité des termes produits $X_1 X_2$ (de même signe que X_2) et par les termes au carré en X_2^2 et $X_1^2 X_2^2$ qui traduisent le fait que la synergie est maximale pour les valeurs de X_2 (le CCl4) les plus élevées.

Pour l'enzyme GOT, seule la variable X_2 est significative de telle sorte que l'équation est réduite à une fonction affine et sans effet d'interaction significatif entre le CCl4 et l'éthanol. Ceci est dû à l'importante dispersion des valeurs mesurées dans les triplicats.

L'exploitation mathématique des résultats peut être poursuivie. A partir de l'équation générale (1), il est possible de calculer des équations simplifiées pour chaque valeur codée de X_1 et d'introduire ensuite les valeurs codées de X_2 afin d'obtenir des valeurs théoriques du relargage de la LDH par la modélisation mathématique.

Pour $X_1 = -1$ on a l'équation simplifiée (1)

$$1013 + 9 X_2 - 5,7 (X_2^2 - 5)$$

Pour $X_1 = 0$ on a l'équation simplifiée (2)

$$1407 + 195 X_2 - 13,7 (X_2^2 - 5)$$

Pour $X_1 = +1$ on a l'équation simplifiée (3)

$$1801 + 381 X_2 + 120,3 (X_2^2 - 5)$$

De même, pour l'enzyme GPT les équations simplifiées suivantes sont obtenues à partir de l'équation générale (2).

Pour $X_1 = -1$ on a l'équation simplifiée (4)

$$99,8 + 1,9 X_2 - 0,1 (X_2^2 - 5)$$

Pour $X_1 = 0$ on a l'équation simplifiée (5)

$$131,6 + 17,7 X_2 - 0,84 (X_2^2 - 5)$$

Pour $X_1 = +1$ on a l'équation simplifiée (6)

$$163,4 + 33,5 X_2 + 10,86 (X_2^2 - 5)$$

On obtient ensuite aisément les valeurs de l'activité des enzymes LDH et GPT libérées théoriques qui sont consignées dans le tableau V.

La comparaison entre le tableau IV et le tableau V illustre de la bonne prédictivité du modèle.

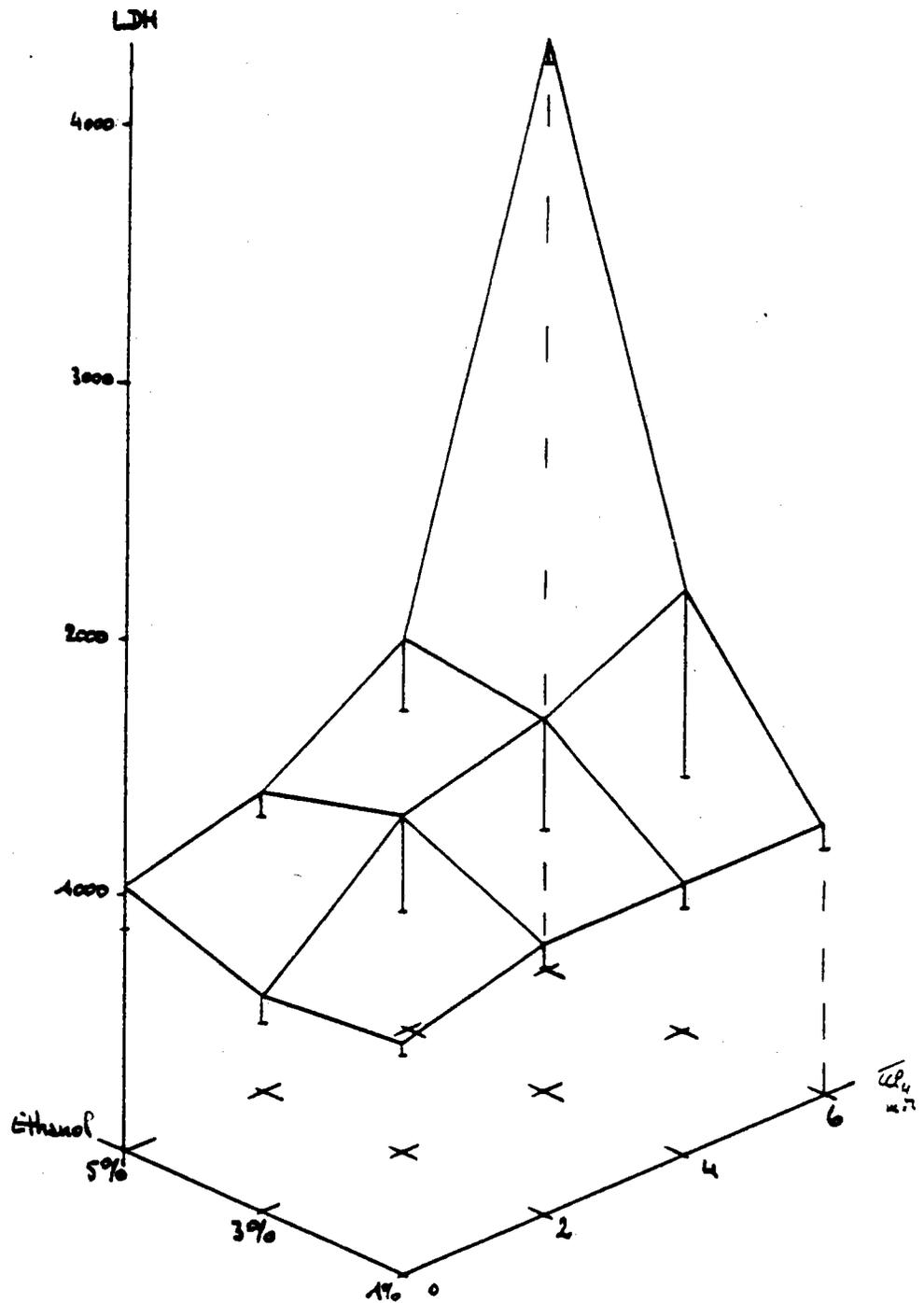


Figure 10 : EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET L'ETHANOL SUR LA FUITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml - écart type (n=3).

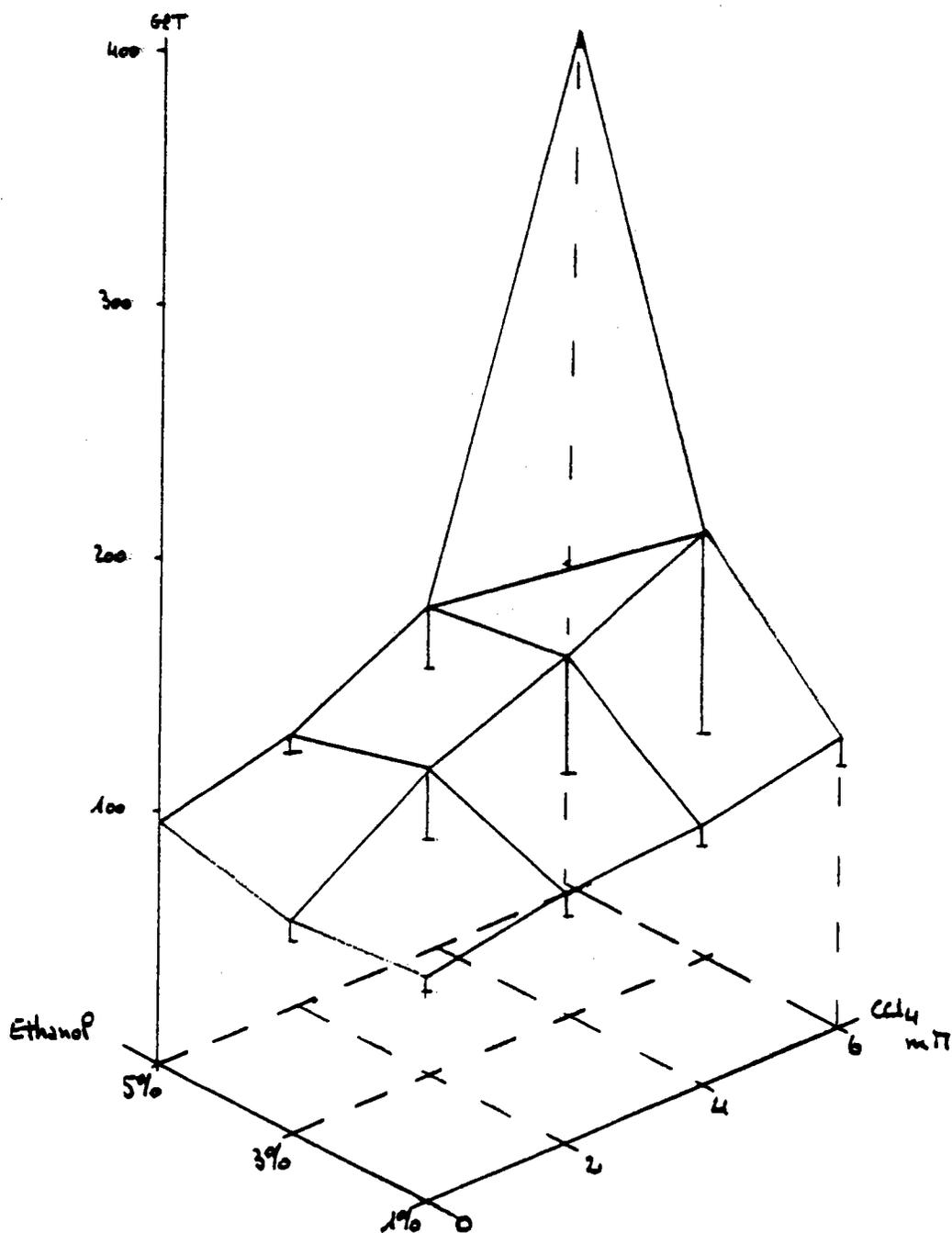


Figure 11 : EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET L'ETHANOL SUR LA FUITE DE L'ENZYME GPT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml - écart type (n=3).

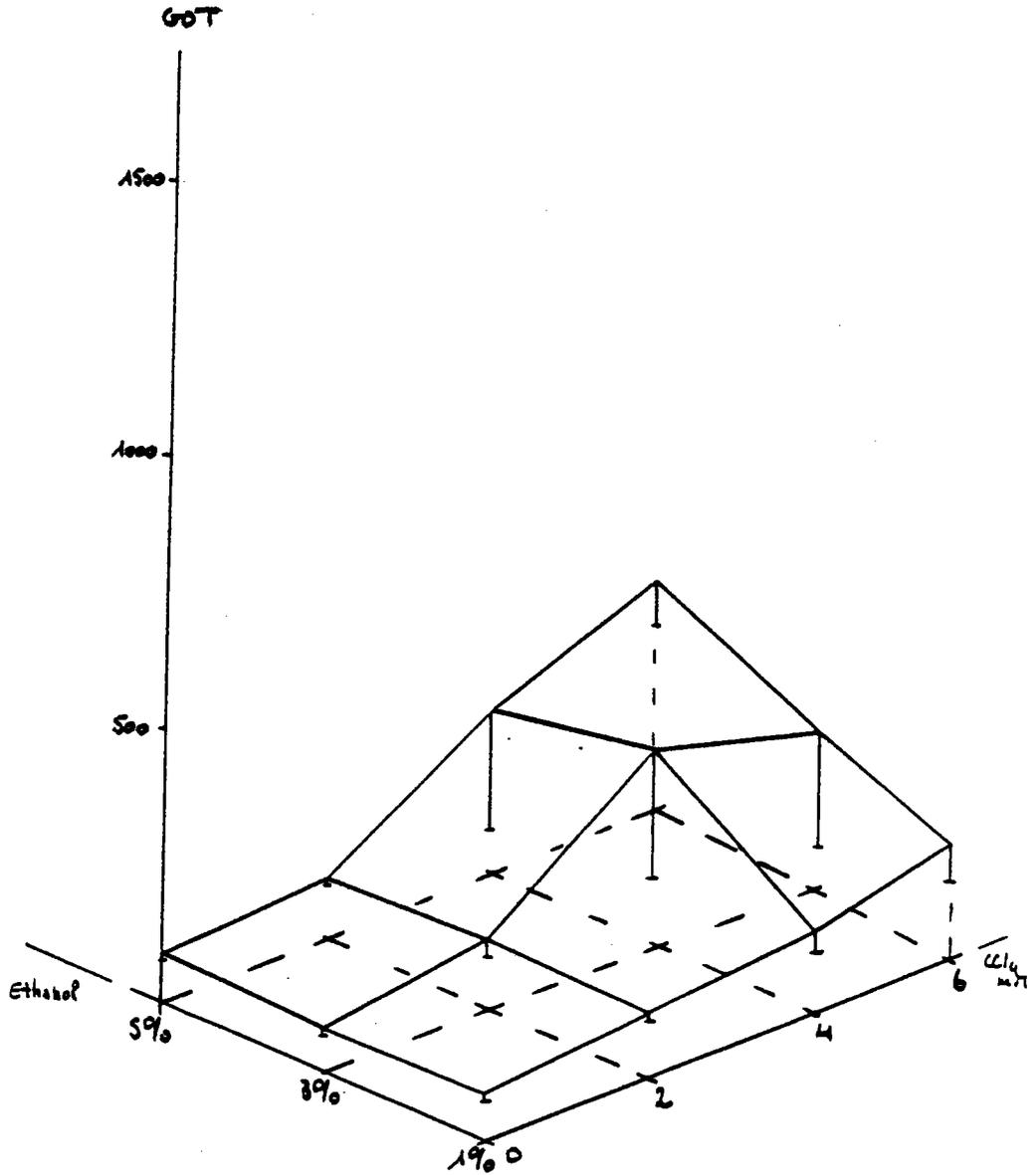


Figure 12 : EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET L'ETHANOL SUR LA FUIE DE L'ENZYME GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml - écart type (n=3).

Tableau IV : EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET L'ETHANOL SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.

Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml ± écart type (n=3).

ETHANOL .	CCL4	LDH	GPT	GOT
1 % .	0 mM	904 ± 52	89 ± 7	86 ± 11
1 % .	2 mM	1058 ± 101	100 ± 11	123 ± 21
1 % .	4 mM	1054 ± 92	102 ± 8	146 ± 36
1 % .	6 mM	1068 ± 112	114 ± 11	208 ± 67
3 % .	0 mM	871 ± 110	84 ± 8	79 ± 9
3 % .	2 mM	1316 ± 385	121 ± 28	129 ± 30
3 % .	4 mM	1459 ± 432	143 ± 46	366 ± 240
3 % .	6 mM	1723 ± 745	169 ± 80	291 ± 212
5 % .	0 mM	1018 ± 150	95 ± 17	89 ± 11
5 % .	2 mM	1156 ± 81	106 ± 5	114 ± 10
5 % .	4 mM	1527 ± 282	134 ± 24	292 ± 224
5 % .	6 mM	3631 ± 100	323 ± 5	403 ± 88
TEMOIN POINT FINAL		564 ± 10	48 ± 0	45 ± 0

Tableau V : VALEURS THEORIQUES CALCULEES PAR MODELISATION AU MOYEN D'UNE REGRESSION MULTIPLE POUR LA MESURE DE LA FUIITE DES ENZYMES LDH ET GPT PROVOQUEE PAR L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET L'ETHANOL DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.

Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml.

ETHANOL .	CCL4	.	LDH	.	GPT
1 % .	0 mM	.	963	.	94
1 % .	2 mM	.	1027	.	98
1 % .	4 mM	.	1045	.	102
1 % .	6 mM	.	1017	.	105
3 % .	0 mM	.	767	.	75
3 % .	2 mM	.	1267	.	117
3 % .	4 mM	.	1657	.	153
3 % .	6 mM	.	1947	.	181
5 % .	0 mM	.	1139	.	106
5 % .	2 mM	.	939	.	87
5 % .	4 mM	.	1701	.	154
5 % .	6 mM	.	3425	.	307

41132. INTERACTION ENTRE LE CCl4 ET LE DMSO.

Les résultats sont présentés sous forme graphique dans les figures 13, 14, 15 et l'ensemble des valeurs numériques mesurées est présenté tableau VI.

Le modèle obtenu à partir de la régression multiple permet d'établir pour chaque enzyme les équations générales suivantes :

l'équation générale (1) pour la LDH

$$2482 + 345 X_2 + 252 X_1 - 72 (X_1^2 - 0,7) (X_2^3 - 8,2X_2) + 39,9 (X_2^2 - 5) + 39,1 X_1 (X_2^2 - 5)$$

l'équation générale (2) pour la GPT

$$194,4 + 31,2 X_2 + 25 X_1 - 5,8_3 (X_1^2 - 0,7) (X_2^3 - 8,2X_2) + 3,2_2 (X_2^2 - 5) + 3,7 X_1 (X_2^2 - 5) + 2,4 X_1 (X_2^3 - 8,2X_2) - 4,2 (X_1^2 - 0,7) (X_2^2 - 5)$$

l'équation générale (3) pour la GOT

$$632,9 + 183,5 X_2 + 20,9 X_1 (X_2^2 - 5) + 15,2_3 (X_2^2 - 5) - 19,9 (X_1^2 - 0,7) (X_2^3 - 8,2X_2) + 10 X_1 (X_2^3 - 8,2X_2) - 8 (X_2^3 - 8,2X_2) + 50 X_1 + 19,4 X_1 X_2 - 18,3 (X_1^2 - 0,7) (X_2^2 - 5)$$

Pour l'enzyme LDH, à partir de la représentation graphique et du modèle calculé selon la régression multiple (équation générale 1), il n'apparaît pas de synergie simple entre X1 et X2 mais des interactions complexes qui se manifestent par la venue de termes en X2³ de signe opposé à X2. Ceci se traduit graphiquement par un relief montagneux avec une vallée entre des pics. Ces ruptures de pente traduisent un antagonisme aux points bas, c'est à dire lorsque la concentration en DMSO est égale à 3% avec le CCl4 est à 4 mM ou lorsque la concentration en DMSO est égale à 5% avec le CCl4 à 2 mM. Chaque variable X1 ou X2 est importante, leurs coefficients positifs sont élevés, la variable X2 devient prépondérante compte tenu des coefficients affectés à la variable simple et à la variable au carré. Le poids du CCl4 est ainsi maximal pour les valeurs de X2 élevées.

Pour l'enzyme GPT, à partir de la représentation graphique et du modèle calculé selon la régression multiple (équation générale 2), il n'apparaît pas de synergie simple entre X1 et X2 mais des interactions complexes qui se manifestent par la venue de termes en X2² et X2³ dans une forme similaire à ce qui se passe avec la LDH.

Pour l'enzyme GOT, à partir de la représentation graphique et du modèle calculé selon la régression multiple (équation générale 3), il apparaît une synergie entre X1 et X2 en particulier pour les concentrations en CCl4 élevées. L'équation du modèle souligne la synergie entre X1 et X2 qui se manifeste par l'apparition du terme produit X1X2 de même signe que X2. Cependant, des interactions complexes existent et se repèrent par

la présence de termes en x_2^2 et x_2^3 .

Si, comme nous l'avons précédemment développé dans l'étude de l'interaction entre le CCl_4 et l'éthanol, nous poursuivons un peu plus loin l'exploitation mathématique, des équations simplifiées peuvent se calculer de façon itérative pour chaque enzyme.

On obtient ainsi pour la LDH les équations simplifiées suivantes

Pour $X_1 = -1$ on a l'équation simplifiée (1)

$$2230 + 345 X_2 + 0,8 (X_2^2 - 5) - 21,6 (X_2^3 - 8,2X_2)$$

Pour $X_1 = 0$ on a l'équation simplifiée (2)

$$2482 + 345 X_2 + 39,9 (X_2^2 - 5) - 50,4 (X_2^3 - 8,2X_2)$$

Pour $X_1 = +1$ on a l'équation simplifiée (3)

$$2734 + 345 X_2 + 79 (X_2^2 - 5) - 21,6 (X_2^3 - 8,2X_2)$$

On obtient ainsi pour la GPT les équations simplifiées suivantes

Pour $X_1 = -1$ on a l'équation simplifiée (4)

$$169,4 + 31 X_2 - 1,76 (X_2^2 - 5) - 4,14 (X_2^3 - 8,2X_2)$$

Pour $X_1 = 0$ on a l'équation simplifiée (5)

$$194,4 + 31 X_2 + 7,4 (X_2^2 - 5) + 5,8 (X_2^3 - 8,2X_2)$$

Pour $X_1 = +1$ on a l'équation simplifiée (6)

$$219,4 + 31 X_2 + 5,64 (X_2^2 - 5) + 0,66 (X_2^3 - 8,2X_2)$$

On obtient ainsi pour la GOT les équations simplifiées suivantes

Pour $X_1 = -1$ on a l'équation simplifiée (7)

$$582,9 + 164,1 X_2 - 11,19 (X_2^2 - 5) - 23,97 (X_2^3 - 8,2X_2)$$

Pour $X_1 = 0$ on a l'équation simplifiée (8)

$$632,9 + 183,5 X_2 + 20,69 (X_2^2 - 5) + 5,93 (X_2^3 - 8,2X_2)$$

Pour $X_1 = +1$ on a l'équation simplifiée (9)

$$682,9 + 202,9 X_2 + 30,6 (X_2^2 - 5) - 3,97 (X_2^3 - 8,2X_2)$$

On instille ensuite dans chaque équation simplifiée les valeurs codées que prend la variable X_2 ce qui permet de calculer les valeurs théoriques de l'activité des 3 enzymes LDH, GPT et GOT libérées qui sont consignées dans le tableau VII.

La comparaison entre les valeurs mesurées lors de l'expérience et les valeurs calculées par modélisation démontre l'intérêt prédictif d'une telle application.

Ce développement mathématique représente sans doute la méthode la plus puissante qui soit à la disposition du chercheur pour aborder l'étude in extenso des phénomènes d'interactions entre plusieurs produits. En effet, d'après VAILLANT, la méthode des Plans Factoriels Complets correspondrait à la mentalité germanique soucieuse de ne négliger aucun point du domaine à explorer.

Cependant, d'un point de vue biologique, si l'on peut souligner le faible taux de relargage des enzymes dosées en fin d'expérience soit plus de trois heures après l'obtention de la suspension (moins de 25 % pour la LDH, moins de 21 % pour la GPT et moins de 8 % pour la GOT), il faut noter le caractère de sensibilité aigue de cette préparation d'hépatocytes de rat qui se traduit par des fuites enzymatiques importantes car même aux faibles doses de solvant (1%) une élévation du relargage de LDH et de GPT est enregistrée.

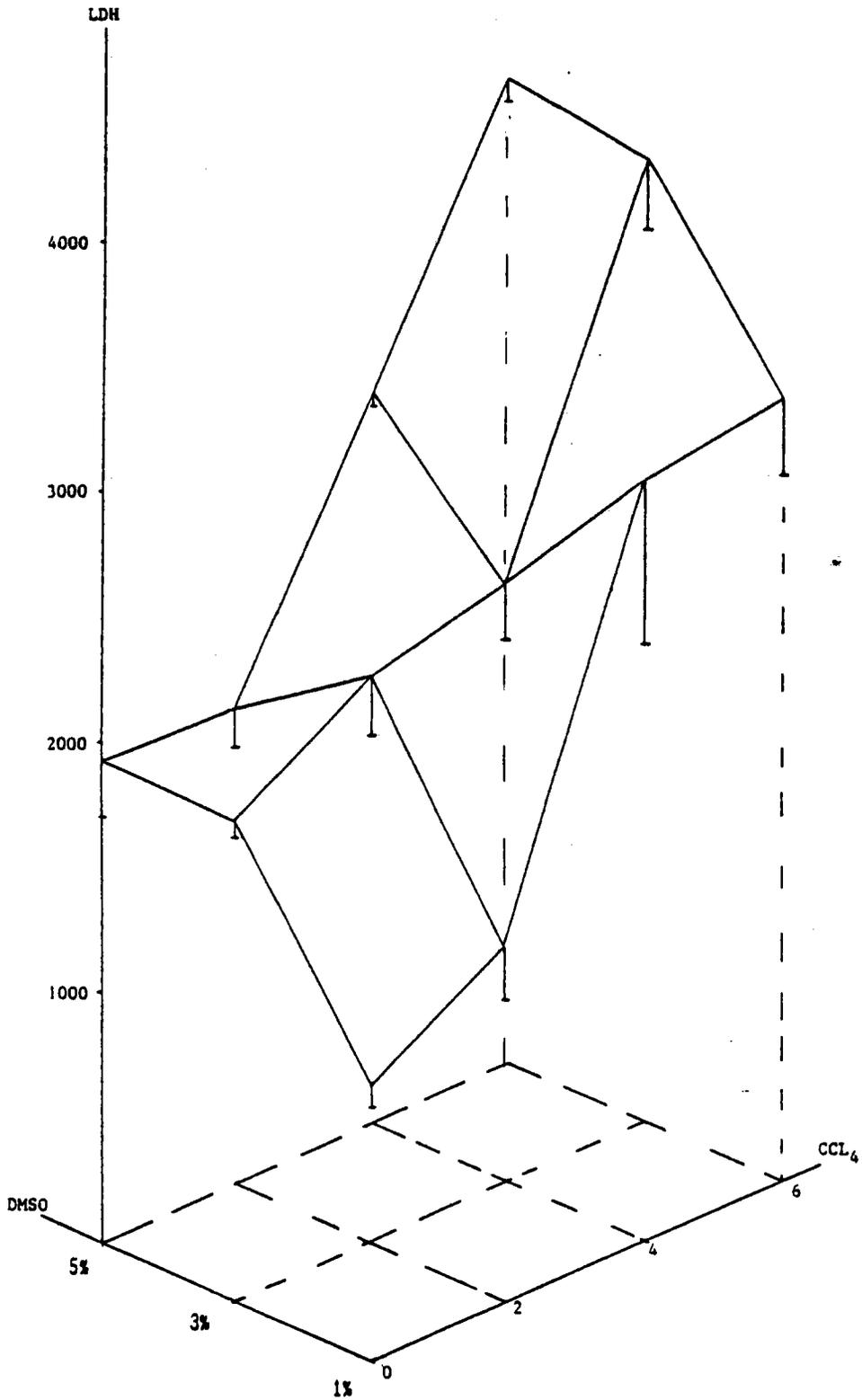


Figure 13 : EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET LE DMSO SUR LA FUIE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml - écart type (n=3).

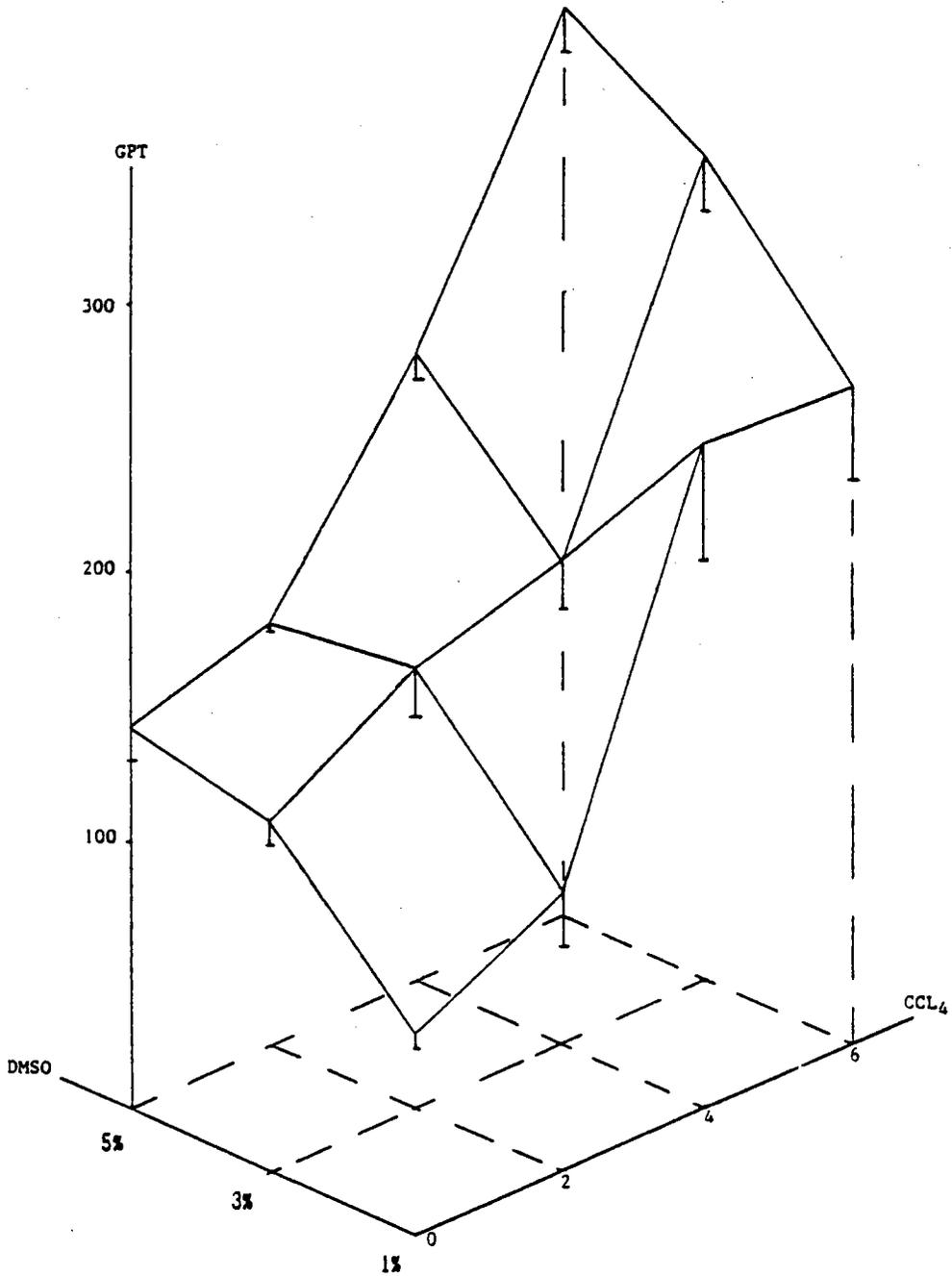


Figure 14 : EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET LE DMSO SUR LA FUITE DE L'ENZYME GPT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml - écart type (n=3).

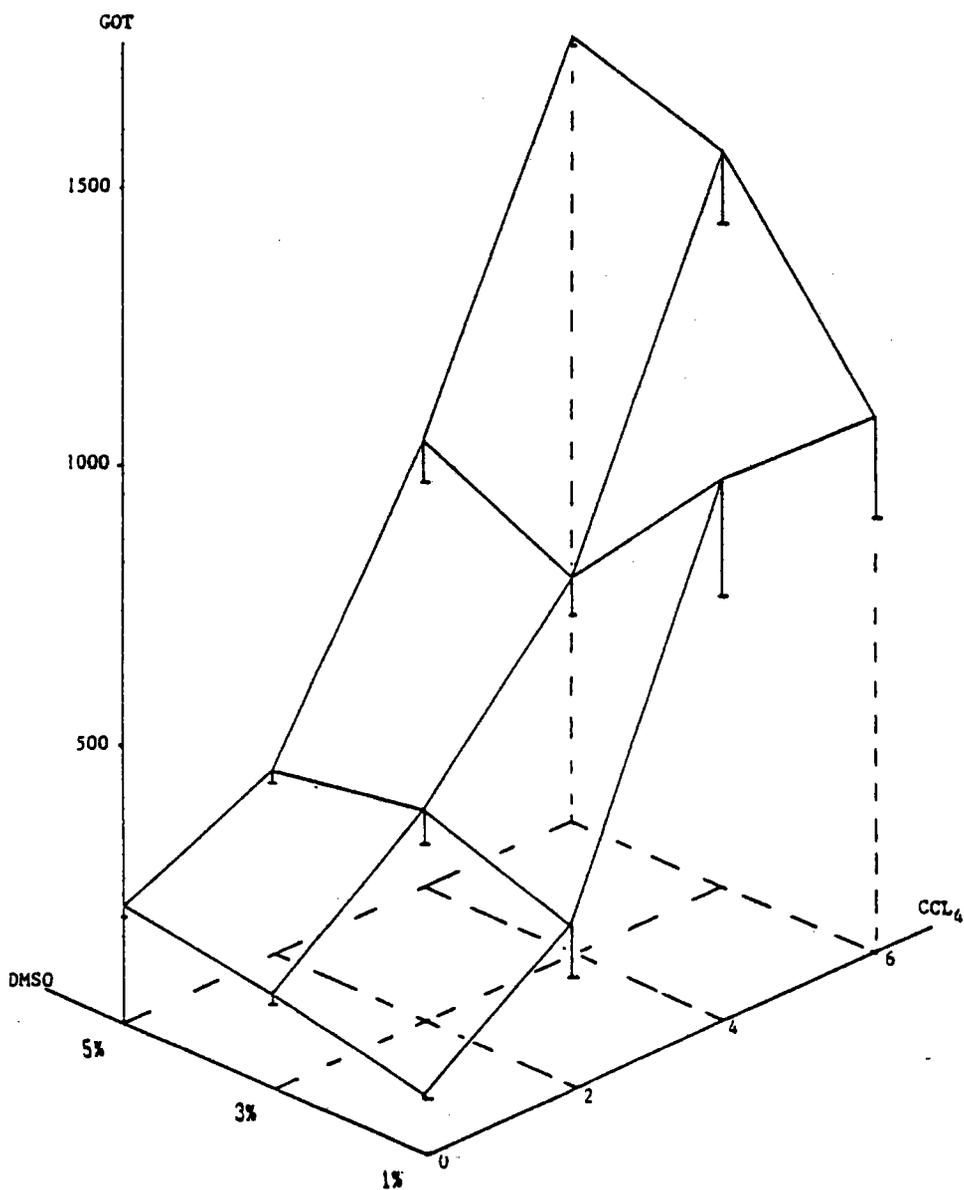


Figure 15 : EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET LE DMSO SUR LA FUIITE DE L'ENZYME GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml - écart type (n=3).

Tableau VI : EFFET DE L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET LE DMSO SUR LA FUIITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.

Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml ± écart type (n=3).

DMSO	CCL4	LDH	GPT	GOT
1 %	0 mM	1100 ± 72	76 ± 6	107 ± 9
1 %	2 mM	1418 ± 201	104 ± 19	289 ± 94
1 %	4 mM	3034 ± 652	248 ± 45	969 ± 209
1 %	6 mM	3128 ± 301	246 ± 35	963 ± 180
3 %	0 mM	1918 ± 67	132 ± 7	171 ± 10
3 %	2 mM	2258 ± 251	164 ± 18	376 ± 59
3 %	4 mM	2388 ± 214	180 ± 18	674 ± 64
3 %	6 mM	3840 ± 276	308 ± 19	1318 ± 127
5 %	0 mM	1917 ± 221	142 ± 12	210 ± 21
5 %	2 mM	1908 ± 150	159 ± 2	328 ± 21
5 %	4 mM	2927 ± 46	235 ± 10	796 ± 64
5 %	6 mM	3944 ± 89	338 ± 17	1395 ± 13
TEMOIN POINT FINAL		978 ± 72	72 ± 6	111 ± 7

Tableau VII : VALEURS THEORIQUES CALCULEES PAR MODELISATION AU MOYEN D'UNE REGRESSION MULTIPLE POUR LA MESURE DE LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR L'INTERACTION ENTRE LE CCL4 ET LE DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.

Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml.

DMSO	CCL4	LDH	GPT	GOT
1 %	0 mM	1250	79	103
1 %	2 mM	1726	116	291
1 %	4 mM	2727	237	964
1 %	6 mM	3217	245	973
3 %	0 mM	1728	117	151
3 %	2 mM	1615	176	409
3 %	4 mM	3030	154	691
3 %	6 mM	3556	331	1280
5 %	0 mM	2067	147	206
5 %	2 mM	1917	171	329
5 %	4 mM	2919	223	792
5 %	6 mM	4033	336	1404

412. HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE.

Les hépatocytes de rat sont isolés comme décrit au paragraphe 3221 et mis en culture pour les tests de cytotoxicité comme décrit au paragraphe 3221.

4121. CYTOTOXICITE DU CCl4.

La cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 3221 avec les conditions A.

Après un temps de traitement de 60 minutes, la mesure de l'activité des enzymes libérées LDH, GPT et GOT est évaluée comme décrit au paragraphe 3322.

Les résultats présentés figures 16, 17, 18 et tableau VIII permettent de constater en premier lieu, une légère diminution de la fuite des enzymes LDH, GPT et GOT dans le lot traité par le solvant DMSO 1% par rapport au lot témoin non traité et en second lieu, une augmentation importante du relargage de ces enzymes dans le lot traité avec le CCl4 10 mM, statistiquement significative comparée au lot ayant reçu le solvant DMSO. La comparaison des réponses mesurées avec les différentes enzymes montre que la LDH et la GPT ont cru dans des proportions identiques (290 % et 300 % entre le lot DMSO et le lot CCl4) alors que la mesure de la fuite de GOT manifeste une élévation de 394 %.

L'observation des cultures au microscope photonique inversé à contraste de phase atteste d'un très bon maintien de la qualité du tapis cellulaire dans le lot traité avec le solvant DMSO 1% alors que beaucoup de cellules apparaissent nécrosées dans le lot traité par le CCl4 10 mM, on observe également la présence de nombreux hépatocytes en suspension.

D'autre part, quelques gouttelettes réfringentes sont présentes au fond des boîtes de culture. Il s'agit sans doute du CCl4 non dissout dont la densité supérieure à celle de l'eau le fait couler.

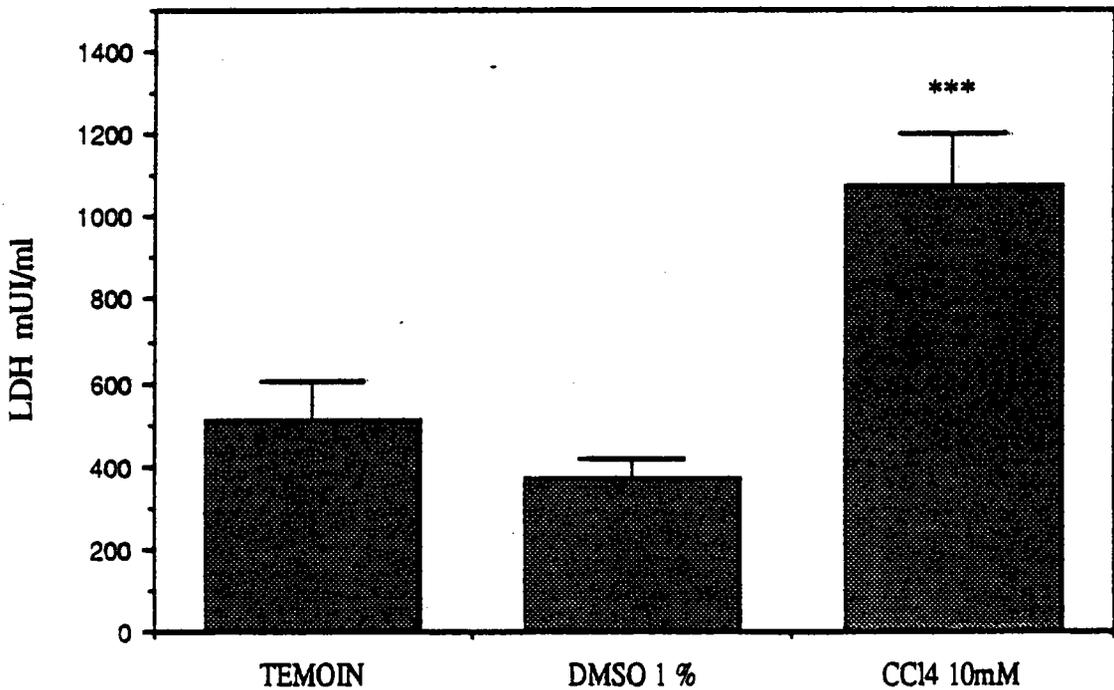


Figure 16 : EFFET DU CCL4 SUR LA FUITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 60 MINUTES.

Après 28 heures de culture, le CCl4 10 mM solubilisé dans le DMSO et ajouté aux cellules sous un volume de 1% Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI / ml (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student (***) p < 0,001).

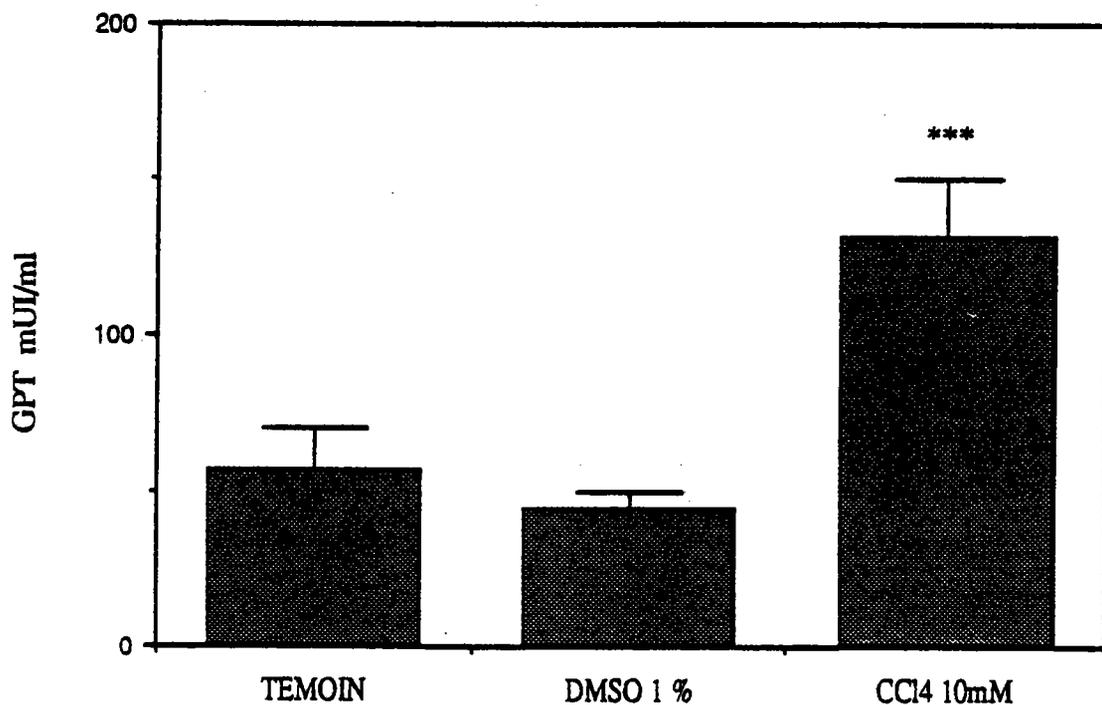


Figure 17 : EFFET DU CCL4 SUR LA FUITE DE L'ENZYME GPT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 60 MINUTES.

Après 28 heures de culture, le CCl4 10 mM solubilisé dans le DMSO et ajouté aux cellules sous un volume de 1% Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI / ml (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student (***) p < 0,001).

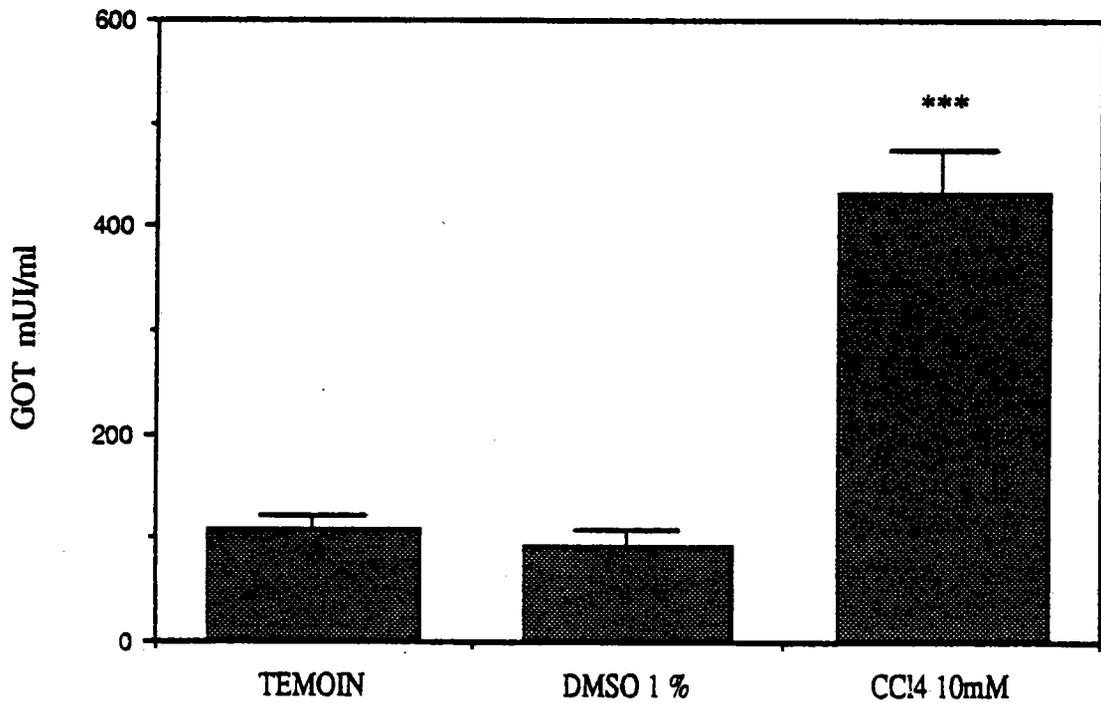


Figure 18 : EFFET DU CCL4 SUR LA FUITE DE L'ENZYME GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 60 MINUTES.

Après 28 heures de culture, le CCl4 10 mM solubilisé dans le DMSO et ajouté aux cellules sous un volume de 1% Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI / ml (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student (***) p < 0,001).

Tableau VIII : EFFET DU CCL4 SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 60 MINUTES.

Après 28 heures de culture, le CCl4 10 mM solubilisé dans le DMSO et ajouté aux cellules sous un volume de 1% Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI / ml (moyenne \pm écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student (***) p < 0,001).

PRODUIT	DOSE	LDH	GPT	GOT
TEMOIN		508 \pm 97	57 \pm 13	110 \pm 12
DMSO	1 %	369 \pm 49	44 \pm 6	93 \pm 17
CCL4	10 mM	1072 \pm 128***	132 \pm 18***	434 \pm 41***

4122. CYTOTOXICITE DE LA D-GALACTOSAMINE.

41221. CYTOTOXICITE DIRECTE DE LA D-GALACTOSAMINE.

La cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 32221 avec les conditions B.

Après un temps de traitement de 24 heures, l'activité des enzymes LDH, GPT et GOT libérées est évaluée comme décrit au paragraphe 3322.

Dans le tableau IX sont regroupés les résultats de 2 essais complémentaires obtenus à partir de 2 préparations d'hépatocytes issues de 2 rats différents. Ces résultats ne font pas ressortir de variation de la fuite des enzymes LDH, GPT ou GOT lorsque les hépatocytes sont traités à des doses de D-galactosamine inférieures à 1 mM comparé au lot témoin non traité (essai 1). En revanche, une diminution assez sensible des relargages de LDH et de GOT est observée dans les lots traités aux doses supérieures à 1 mM comparé au lot témoin non traité (essai 2).

L'observation des cultures au microscope photonique inversé à contraste de phase, ne met en évidence aucune altération de la morphologie des hépatocytes traités par la D-galactosamine durant 24 heures, voire une structure plus homogène du tapis cellulaire.

Tableau IX : EFFET DIRECT DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le MEM complet. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/ml (moyenne \pm écart type, essai 1 n=3, essai 2 n=2).

PRODUIT	DOSE	LDH	GPT	GOT
TEMOIN		508 \pm 97	57 \pm 13	110 \pm 12
GAL-NH2	0,25 mM	526 \pm 69	58 \pm 8	107 \pm 16
GAL-NH2	0,5 mM	559 \pm 122	59 \pm 14	121 \pm 17
GAL-NH2	1 mM	552 \pm 34	58 \pm 11	114 \pm 11
TEMOIN		665 \pm 9	ND	223 \pm 3
GAL-NH2	1 mM	471 \pm 10	ND	173 \pm 2
GAL-NH2	2,5 mM	433 \pm 30	ND	160 \pm 12
GAL-NH2	5 mM	411 \pm 16	ND	144 \pm 4
GAL-NH2	10 mM	395 \pm 56	ND	127 \pm 16

ND = non déterminé

41222. INFLUENCE DU SERUM DE VEAU SUR LA CYTOTOXICITE
DIRECTE DE LA D-GALACTOSAMINE.

La cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 32221 avec les conditions C.

Après un temps de traitement de 29 heures, l'activité de enzyme LDH libérée et totale est évaluée comme décrit au paragraphe 3322.

Les résultats présentés tableau X montrent que l'ajout de sérum de veau nouveau né ne modifie pas la fuite naturelle des enzymes si l'on compare les 2 lots témoins non traités. La fuite de LDH augmente légèrement lorsque les hépatocytes sont traités par la D-galactosamine 0,5 mM en milieu de Williams incomplet mais n'est pas modifiée à la dose de 1 mM comparativement au lot témoin non traité. Une augmentation statistiquement significative est mesurée dans les lots traités par la D-galactosamine en milieu de Williams complet; comparée au lot témoin non traité la fuite de cette enzyme est plus importante pour la concentration de 0,5 mM de toxique que pour la concentration de 1 mM. Cependant, les variations relatives représentent de faibles écarts entre les lots traités et le lot témoin non traité en milieu complet soit 11,5 % pour la différence la plus grande.

L'observation comparative des cultures au microscope photonique inversé à contraste de phase, ne met en évidence aucune altération de la morphologie des hépatocytes traités par la D-galactosamine durant 29 heures.

**Tableau X : INFLUENCE DU SERUM DE VEAU NOUVEAU NE SUR LA
CYTOTOXICITE DIRECTE DE LA D-GALACTOSAMINE DANS LES
HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES
DURANT 29 HEURES.**

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le WME
Les activités enzymatiques sont exprimées en % de
l'activité totale (moyenne \pm écart type, n=3).
Comparaison des moyennes par le test t de Student exact
(* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

PRODUIT	DOSE	MILIEU WME INCOMPLET	MILIEU WME COMPLET
TEMOIN	.	27,1 \pm 3,4	27,0 \pm 1,5
GAL-NH2	0,5 mM	30,4 \pm 1,2 *	38,5 \pm 0,8 ***
GAL-NH2	1 mM	28,9 \pm 1,1	32,5 \pm 2,1 **

41223. CYTOTOXICITE RETARDEE DE LA D-GALACTOSAMINE.

A. ESSAI 1.

La cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 32221 avec les conditions D.

Après un temps de traitement de 24 heures et pour chaque temps de prélèvement, l'activité de l'enzyme LDH libérée est évaluée comme décrit au paragraphe 3322.

Les résultats présentés figure 19 et tableau XI montrent qu'après 24 heures de contact avec la D-galactosamine, la fuite de l'enzyme LDH dans les lots traités est inférieure à celle mesurée dans le lot témoin non traité, les variations de relargage sont inversement proportionnelles à la concentration de D-galactosamine de telle sorte que l'on peut établir le classement suivant : 5 mM < 2,5 mM < 1 mM < témoin.

Pour les temps de prélèvement suivants, le milieu ayant été remplacé par du milieu sans D-galactosamine, aucune variation du relargage de LDH n'est mesurée dans le lot traité à la dose 1 mM de toxique, ce taux reste faible et stable dans le temps tout comme le lot témoin non traité.

A la concentration de 2,5 mM de D-galactosamine, on observe une augmentation du relargage de la LDH comparée au lot témoin non traité. L'écart entre le lot traité à cette dose et le lot témoin est constant durant les 72 premières heures de culture et s'accroît au temps 96 heures.

A la concentration de 5 mM de D-galactosamine, la fuite de LDH évolue selon trois cinétiques. Une première phase à pente forte entre le temps 36 heures et le temps 50 heures, une seconde phase à pente constante entre le temps 50 heures et le temps 72 heures et une troisième phase avec reprise de pente faible entre le temps 72 heures et le temps 96 heures.

Compte tenu de l'effectif modeste de chaque lot (n=2), une exploitation statistique de cette expérience ne peut être envisagée car le nombre de degrés de liberté est nul.

L'observation comparative des cultures au microscope photonique inversé à contraste de phase, met en évidence un bon maintien de la morphologie des hépatocytes témoins et traités par la D-galactosamine 1 mM alors que pour les doses supérieures une altération importante de la qualité des cultures est observée (apparition de vacuoles de lyse réfringentes, modifications des contours cellulaires qui deviennent diffus et décrochage des cellules du support).

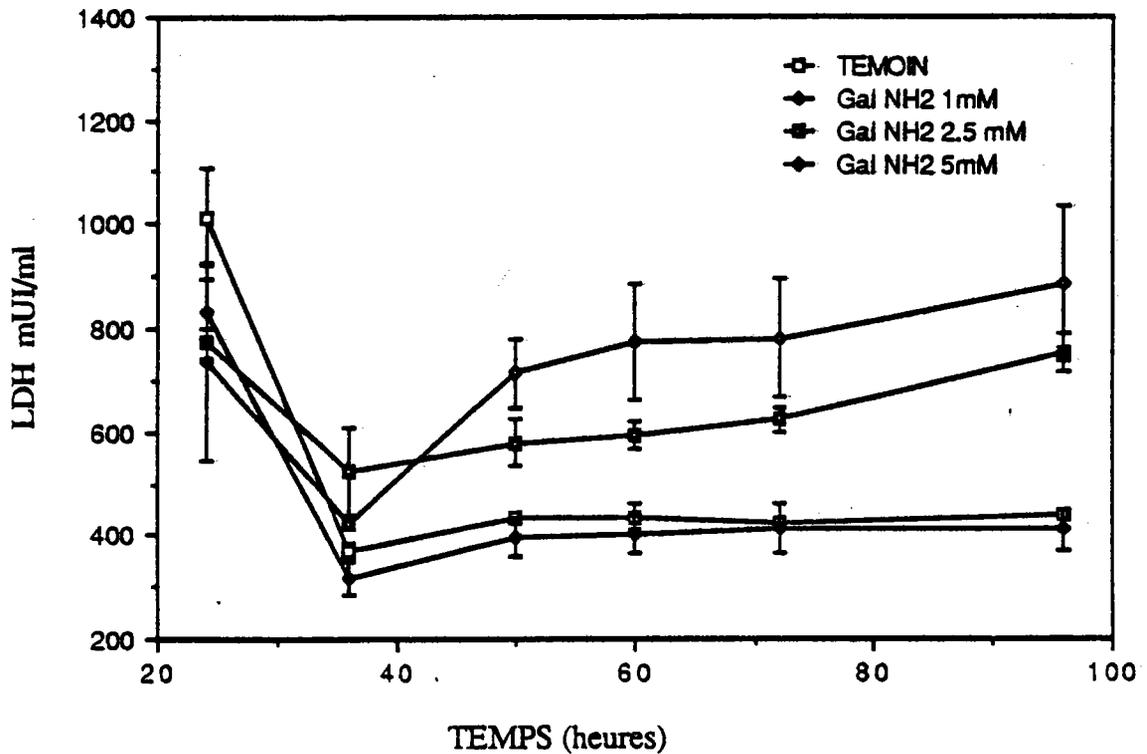


Figure 19 : EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 96 HEURES.

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le L15 complet. Après un temps de traitement de 24 heures et à chaque temps, le milieu est remplacé par du milieu sans D-galactosamine. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI / ml (moyenne \pm écart type, n=2).



Tableau XI : EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUIITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 96 HEURES.

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le L15 complet. Après un temps de traitement de 24 heures et à chaque temps, le milieu est remplacé par du milieu sans D-galactosamine. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI / ml (moyenne \pm écart type, n=2).

TEMPS	TEMOIN	D-GALACTOSAMINE		
		1 mM	2,5 mM	5 mM
24 heures	1015 \pm 95	832 \pm 65	772 \pm 28	738 \pm 192
36 heures	370 \pm 14	318 \pm 31	522 \pm 88	425 \pm 14
50 heures	431 \pm 5	394 \pm 37	578 \pm 45	713 \pm 68
60 heures	436 \pm 24	402 \pm 36	595 \pm 26	773 \pm 113
72 heures	422 \pm 2	411 \pm 47	623 \pm 23	780 \pm 115
96 heures	440 \pm 9	410 \pm 38	754 \pm 37	885 \pm 148

B. ESSAI 2.

La cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 32221 avec les conditions E.

Pour chaque temps de prélèvement, l'activité de l'enzyme LDH libérée est évaluée comme décrit au paragraphe 3322.

Les résultats présentés figure 20 et tableau XII montrent qu'au temps 24 heures, soit 2 heures après que le milieu de traitement contenant le toxique ait été remplacé par du milieu neuf sans D-galactosamine, la fuite de l'enzyme LDH est déjà différente entre le lot témoin non traité et les lots intoxiqués de telle sorte que l'on puisse établir le classement suivant : témoin < 5 mM < 2,5 mM < 0,5 mM < 1 mM, soit un relargage de LDH inversement proportionnel à la dose de D-galactosamine utilisée. Comparées au lot témoin non traité, les valeurs mesurées dans les lots intoxiqués sont statistiquement différentes, cependant l'interprétation biologique doit prendre en compte à la fois la faiblesse intrinsèque des mesures ainsi que la très petite dispersion des résultats intra-groupe en situant les moyennes par rapport à l'ensemble des mesures obtenues aux divers temps de prélèvement de telle sorte que les fuites de LDH ne sont en fait pas interprétables en tant que phénomène toxique majeur pour ce temps de 24 heures.

Pour les temps suivants (42 et 72 heures) la fuite de LDH augmente de façon régulière aussi bien en fonction de la dose de D-galactosamine qu'en fonction du temps de telle sorte que l'on établisse le classement suivant : témoin < 0,5 mM < 1 mM < 2,5 mM < 5 mM. On observe en fait 2 cinétiques, une phase de relargage rapide entre le temps 24 heures et le temps 42 heures et une phase de relargage plus lent entre le temps 42 heures et le temps 72 heures. Pour chaque temps, les moyennes des lots traités sont toutes statistiquement différentes du lot témoin non traité.

L'observation comparative des cultures au microscope photonique inversé à contraste de phase, met en évidence un bon maintien de la morphologie des hépatocytes témoins et traité par la D-galactosamine 0,5 mM et quelques légers signes de toxicité à la dose de 1 mM en fin d'expérience. A la dose de 5 mM, on note l'apparition d'une nécrose hépatocytaire généralisée qui s'accompagne d'un décrochage des cellules du support dès le temps 42 heures. La dose de 2,5 mM montre une altération intermédiaire mais qui aboutit à une nécrose quasi totale des hépatocytes en fin d'expérience.

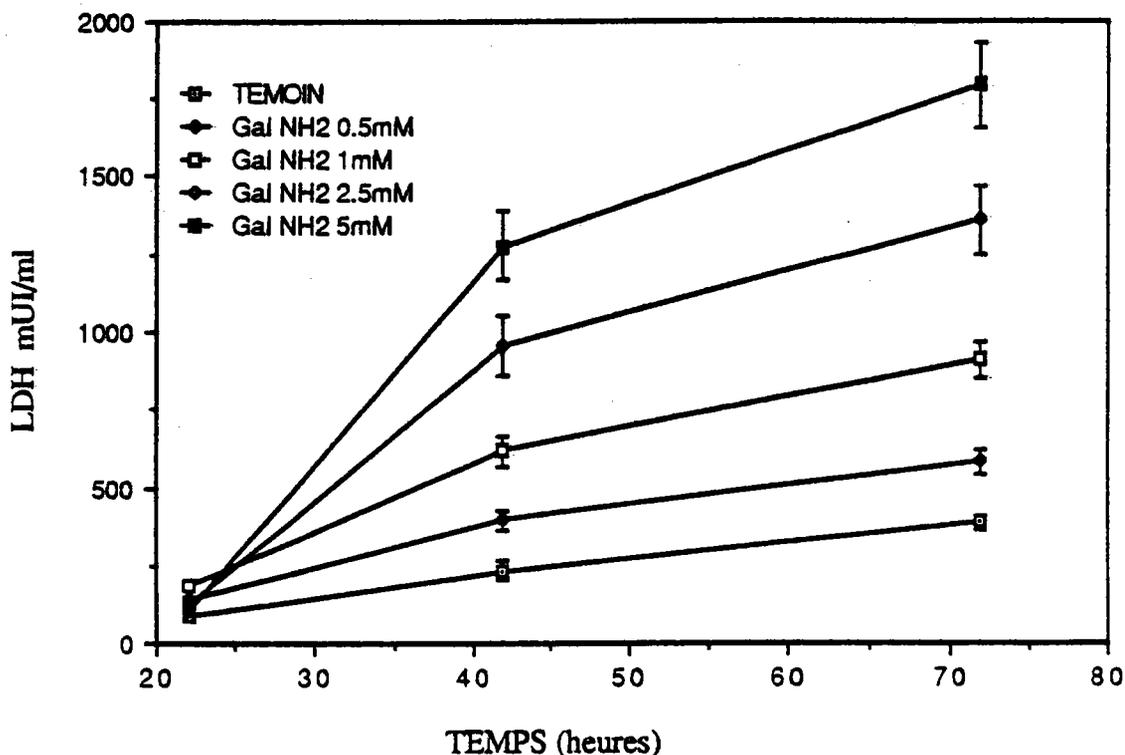


Figure 20 : EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le MEM complet. Après un temps de traitement de 22 heures et à chaque temps, le milieu est remplacé par du milieu L15 complet sans D-galactosamine. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI / ml (moyenne \pm écart type, n=4). Comparaison des moyennes par le test de Bonferroni (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Tableau XII : EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le MEM complet. Après un temps de traitement de 22 heures et à chaque temps, le milieu est remplacé par du milieu L15 complet sans D-galactosamine. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI / ml (moyenne \pm écart type, n=4). Comparaison des moyennes par le test de Bonferroni (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

PRODUIT	DOSE	22 HEURES	42 HEURES	72 HEURES
Témoin		88 \pm 11	234 \pm 28	385 \pm 26
GAL-NH2	0,5 mM	146 \pm 6 ***	395 \pm 32 *	580 \pm 38 ***
GAL-NH2	1 mM	185 \pm 13 ***	616 \pm 48 ***	908 \pm 59 ***
GAL-NH2	2,5 mM	125 \pm 11 **	958 \pm 99 ***	1360 \pm 111***
GAL-NH2	5 mM	109 \pm 14 *	1277 \pm 111 ***	1795 \pm 136***

413. HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE :
CYTOTOXICITE RETARDEE DE LA D-GALACTOSAMINE.

Les hépatocytes humains sont isolés comme décrit au paragraphe 3231. La cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 3232 avec les conditions A.

Pour chaque temps de prélèvement, l'activité de l'enzyme LDH libérée est évaluée comme décrit au paragraphe 3322 et la mesure de l'albumine sécrétée est évaluée dans 2 échantillons pris au hasard dans chaque lot comme décrit au paragraphe 3362.

Les résultats présentés figure 21 et tableau XIII montrent qu'après 20 heures de traitement par des concentrations variables de D-galactosamine, la fuite de l'enzyme LDH n'est pas différente entre les lots traités et le lot témoin non traité.

Au temps 24 heures, soit 4 heures après que le milieu de traitement ait été remplacé par du milieu neuf ne contenant plus de D-galactosamine, le relargage de l'enzyme LDH est du même ordre de grandeur dans tous les lots c'est à dire homogène et faible.

Au temps 44 heures, l'activité de la LDH libérée mesurée dans les lots traités aux doses de 2,5 et 5 mM de toxique est légèrement plus élevée que dans le lot témoin non traité, l'augmentation observée à 5 mM est statistiquement différente du témoin. Les lots traités aux doses de 0,5 et 1 mM ont relargué un peu moins d'enzyme que le lot témoin.

Au temps 72 heures et au temps 96 heures, les mêmes remarques peuvent être formulées qu'au temps 44 heures si ce n'est qu'un accroissement des différences s'installe entre le lot témoin et les lots traités à 2,5 et 5 mM proportionnellement à la dose de toxique. Les moyennes des lots traités à ces doses sont statistiquement différentes du lot témoin non traité.

Les résultats présentés figure 22 et tableau XIV montrent l'influence de la D-galactosamine sur la sécrétion d'albumine. La sécrétion d'albumine augmente régulièrement dans le lot témoin non traité et dans des proportions voisines très faiblement inférieures quant il s'agit des lots traités avec la D-galactosamine aux doses de 0,5 et 1 mM. En revanche, une nette diminution de la quantité d'albumine détectée dans le milieu s'observe lorsque les hépatocytes sont mis en présence de 2,5 mM de D-galactosamine et l'inhibition est quasi totale dans le lot traité avec 5 mM de toxique.

Compte tenu du faible effectif de chaque lot (n=2), une exploitation statistique de ces dosages ne peut être envisagée car le nombre de degrés de liberté est nul.

L'observation comparative des cultures au microscope photonique inversé à contraste de phase, met en évidence un très bon maintien de la morphologie des hépatocytes témoins et traité par la D-galactosamine 0,5 mM et 1 mM jusqu'à la fin de l'expérience. La dose de 2,5 mM entraîne une alteration de la qualité des cultures intermédiaire à celle qui atteint les hépatocytes traités à la forte dose de 5 mM pour laquelle un certain nombre de cellules manifestent des signes de souffrance et de dégénérescence dramatiques.

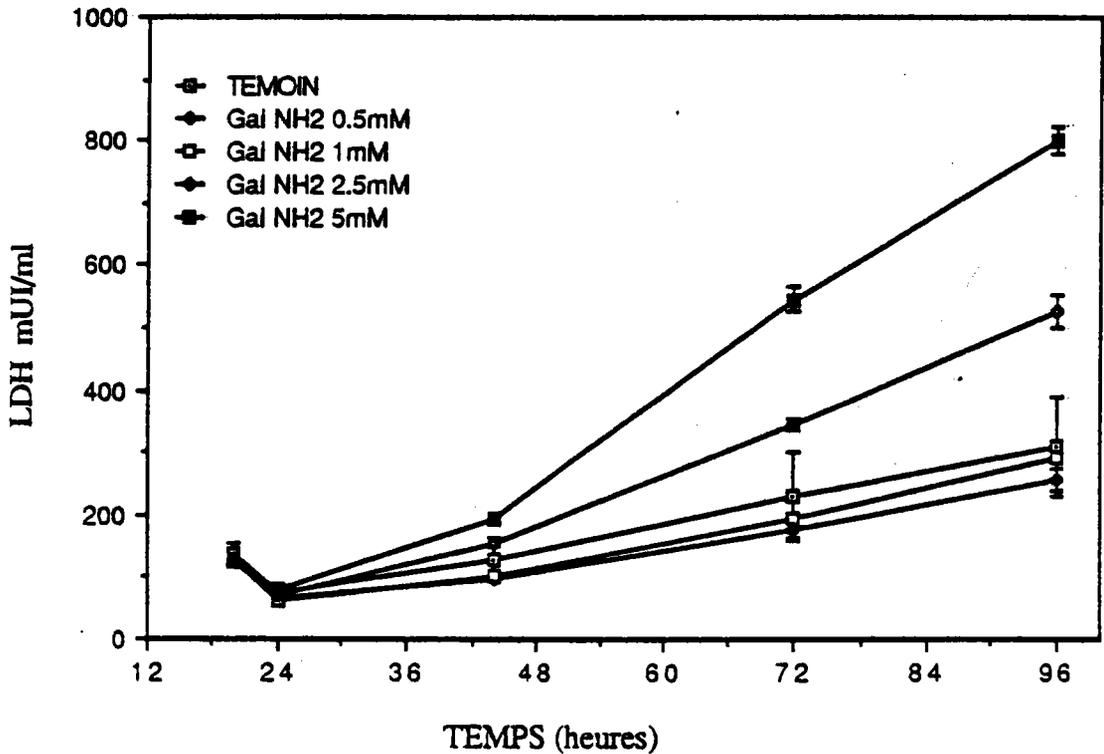


Figure 21 : EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 96 HEURES.

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le L15 complet. Après un temps de traitement de 20 heures et à chaque temps, le milieu est remplacé par du milieu L15 complet sans D-galactosamine. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI / ml (moyenne \pm écart type, n=4). Comparaison des moyennes par le test de Student Welch (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Tableau XIII : EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA FUIITE DE L'ENZYME LDH DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 96 HEURES.

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le L15 complet. Après un temps de traitement de 20 heures et à chaque temps, le milieu est remplacé par du milieu L15 complet sans D-galactosamine. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI / ml (moyenne \pm écart type, n=4). Comparaison des moyennes par le test de Student Welch (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

PRODUIT	DOSE	20 Heures	24 Heures	44 Heures	72 Heures	96 Heures
Témoin		139 \pm 17	76 \pm 7	130 \pm 32	230 \pm 71	309 \pm 80
GAL-NH2	0,5 mM	127 \pm 10	65 \pm 1	97 \pm 5	177 \pm 12	257 \pm 19
GAL-NH2	1 mM	128 \pm 3	64 \pm 3	102 \pm 3	195 \pm 7	292 \pm 7
GAL-NH2	2,5 mM	126 \pm 4	73 \pm 2	154 \pm 3	345 \pm 9	* 528 \pm 27 **
GAL-NH2	5 mM	123 \pm 5	79 \pm 2	194 \pm 10 **	546 \pm 19 ***	800 \pm 23 ***

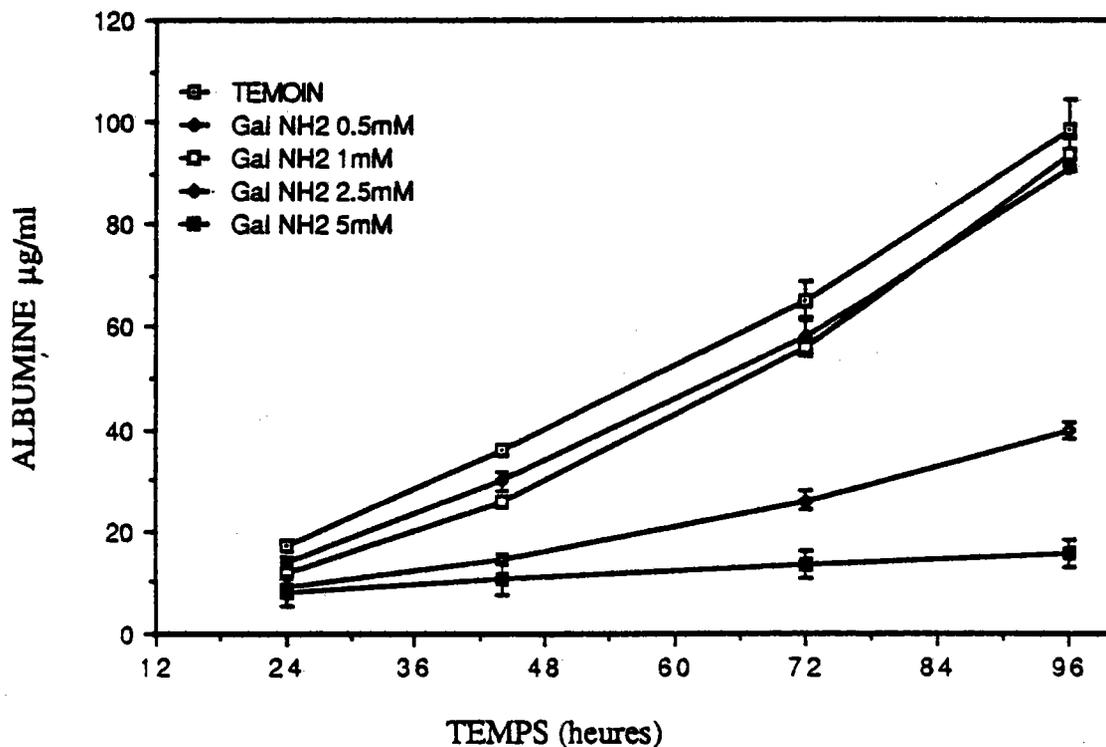


Figure 22 : EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA SECRETION D'ALBUMINE DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 96 HEURES.

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le L15 complet. Après un temps de traitement de 20 heures et à chaque temps, le milieu est remplacé par du milieu L15 complet sans D-galactosamine. Les concentrations d'albumine sont exprimées en ug/ml (moyenne \pm écart type, n=2).

Tableau XIV : EFFET RETARDE DE LA D-GALACTOSAMINE SUR LA
SECRETION D'ALBUMINE DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS
EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 96 HEURES.

La D-galactosamine est solubilisée et diluée dans le L15 complet. Après un temps de traitement de 20 heures et à chaque temps, le milieu est remplacé par du milieu L15 complet sans D-galactosamine. Les concentrations d'albumine sont exprimées en ug/ml (moyenne + écart type, n=2).

TRAITEMENT	24 HEURES	44 HEURES	72 HEURES	96 HEURES
Témoin	. 17,1 ± 0	. 36,2 ± 0,4	. 65,0 ± 3,7	. 98,6 ± 6,0
GAL-NH2 0,5 mM	. 13,8 ± 1,4	. 29,9 ± 2,1	. 58,3 ± 3,8	. 91,1 ± 0,4
GAL-NH2 1 mM	. 11,9 ± 0,1	. 26,0 ± 0,2	. 56,0 ± 0,8	. 93,6 ± 3,0
GAL-NH2 2,5 mM	. 9,0 ± 0,6	. 14,7 ± 1,0	. 26,0 ± 1,8	. 39,9 ± 1,6
GAL-NH2 5 mM	. 8,2 ± 2,9	. 10,5 ± 2,8	. 13,5 ± 2,5	. 15,7 ± 2,8

42. RECHERCHE D'UNE EVENTUELLE CYTOTOXICITE DES EXTRAITS DE PLANTE *in vitro* DANS LES HEPATOCYTES EN CULTURE.

Si l'évaluation des potentialités hépatotropes des extraits de plantes présente un intérêt tout particulier, la vérification préalable de leur innocuité est essentielle. Dans ce but, nous avons testé l'éventuelle cytotoxicité de 2 extraits d'*Eupatorium cannabinum* sur différents modèles *in vitro* d'hépatocytes en culture. Dans un premier temps, un effet cytotoxique a été recherché avec des hépatocytes de rat en suspension (expériences à court terme) puis avec des hépatocytes de rat en culture primaire "classique" et en micro-méthode (expériences sur 24 heures) et enfin avec des hépatocytes humains en culture primaire (expériences sur 72 heures). La cytotoxicité de la silymarine extraite du Chardon Marie a été évaluée sur les hépatocytes de rat en culture primaire (expériences sur 24 heures).

421. HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION.

Les hépatocytes de rat sont isolés comme décrit au paragraphe 3211.

4211. CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT E 5141-3A.

La cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 3212 avec les conditions C. La concentration maximale testée (25 mg de plante sèche / ml de suspension cellulaire) correspond au seuil supérieur de solubilité du lyophilisat dans la solution mère.

Après un temps de traitement de 30 minutes, la mesure de l'activité des enzymes libérées LDH, GPT et GOT est évaluée comme décrit au paragraphe 3321.

Les résultats présentés tableau XV sont obtenus à partir de 3 préparations d'hépatocytes provenant de rat différents. A la concentration de 0,25 mg de plante sèche / ml de suspension cellulaire, la fuite de LDH diminue significativement alors que les fuites de GPT et de GOT augmentent très légèrement, comparé au lot témoin.

A la concentration de 2,5 mg de plante sèche / ml de suspension cellulaire, aucune modification de la fuite des enzymes LDH, GPT et GOT n'est observée comparé au lot témoin.

A la concentration de 25 mg de plante sèche / ml de suspension cellulaire, la fuite des trois enzymes LDH, GPT et GOT augmente très significativement comparé au lot témoin.

Tableau XV : EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUIITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 30 MINUTES.

L'extrait E 5141-3A est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et ajouté aux hépatocytes sous un volume de 5%. Les concentrations sont exprimées en mg de plante sèche/ml de suspension cellulaire. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml. (moyenne ± écart type). Comparaison des moyennes par le test t de Student (** p < 0,01 ; *** p < 0,001).

PRODUIT	DOSE	LDH	GPT	GOT	n
Témoin	.	242 ± 16	19 ± 2	85 ± 12	5
E 5141-3A	0,25	154 ± 48**	25 ± 4	102 ± 18	5
Témoin	.	394 ± 114	43 ± 8	61 ± 17	3
E 5141-3A	2,5	464 ± 5	40 ± 3	60 ± 6	3
Témoin	.	269 ± 47	60 ± 9	87 ± 15	5
E 5141-3A	25	799 ± 54***	123 ± 11***	170 ± 11***	5

4212. CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT RT 1096.

La cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 3212 avec les conditions D.

Après un temps de traitement de 60 minutes, la mesure de l'activité des enzymes libérées LDH, GPT et GOT est évaluée comme décrit au paragraphe 3321.

Les résultats présentés tableau XVI montrent qu'aux trois concentrations testées, aucune modification de la fuite des enzymes LDH, GPT et GOT n'est observée comparé aux lots témoins.

Remarque :

Les concentrations testées dans cet essai ont été déterminées en fonction des résultats obtenus avec l'extrait E 5141-3A, dans une fourchette de concentrations supposées non toxiques et qui pouvaient présenter une activité hépatotrope.

Tableau XVI : EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUIITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION TRAITES DURANT 60 MINUTES.

L'extrait RT 1096 est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et ajouté aux hépatocytes sous un volume de 1%. Les concentrations sont exprimées en mg de plante sèche/ml de suspension cellulaire. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml. (moyenne \pm écart type, n=4). Comparaison des moyennes par analyse de variance: pas de différence significative.

PRODUIT	DOSE	LDH	GPT	GOT
Témoin		707 \pm 47	35 \pm 2	56 \pm 3
RT 1096	1,25	645 \pm 21	32 \pm 1	51 \pm 2
RT 1096	2,5	637 \pm 64	30 \pm 3	48 \pm 4
RT 1096	5	656 \pm 53	31 \pm 3	48 \pm 4

422. HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE.

4221. MODELE CLASSIQUE.

Les hépatocytes de rat sont isolés comme décrit au paragraphe 3221 et la cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 3221 avec les conditions F.

42211. CYTOTOXICITE DES EXTRAITS AQUEUX D'EUPATOIRE: E 5141-3A et RT 1096.

Après un temps de traitement de 24 heures, la mesure de l'activité des enzymes libérées LDH, GPT et GOT est évaluée comme décrit au paragraphe 3322. La quantité de protéines totales est déterminée comme décrit au paragraphe 3331. L'observation cytomorphologique des cellules est effectuée comme décrit au paragraphe 341 et 3422.

Les résultats présentés tableau XVII montrent d'une part, que l'extrait E 5141-3A n'augmente pas la fuite des enzymes LDH et GPT aux concentrations inférieures à 5 mg de plante sèche/ml et diminue la fuite de GOT entre 1,25 et 5 mg de plante sèche/ml mais qu'une augmentation significative dose dépendante est observée aux concentrations de 10 et 20 mg de plante sèche/ml; d'autre part, que l'extrait RT 1096 diminue un peu la fuite de ces enzymes comparé au lot témoin non traité sans que ces faibles variations ne puissent être interprétées d'un point de vue biologique.

La comparaison des résultats obtenus dans les 2 essais provenant de 2 préparations de foies de rats différents montre la bonne reproductibilité qualitative de cette recherche d'une cytotoxicité des extraits d'*Eupatorium cannabinum* L..

L'observation des cellules au microscope optique inverse à contraste de phase a permis de constater une légère altération des cultures à partir de la concentration de 2,5 mg de plante sèche/ml pour l'extrait E 5141-3A et 5 mg de plante sèche/ml pour l'extrait RT 1096.

L'observation des cellules au microscope électronique à transmission montre que dans le cas du traitement par l'extrait E 5141-3A, on note une dose seuil (2,5 mg de plante sèche/ml) à partir de laquelle le nombre de cadavres cellulaires croit de façon assez régulière jusqu'à concerner la totalité des cellules à la dose de 20 mg de plante sèche/ml (toxicité majeure). Dans le même temps, les cellules viables ne présentent que peu de modifications morphologiques; seuls quelques phénomènes autophagiques sont notés : moindre (+) dans le cas du traitement à la dose de 2,5 mg de plante sèche/ml et modéré (++) dans le cas du traitement à la dose de 10 mg de plante sèche/ml. Dans le cas du traitement par l'extrait RT 1096, on observe le même phénomène, mais ce produit semble présenter pour des doses équivalentes au E 5141-3A un effet cytotoxique moindre sur les hépatocytes. Dans les 2 cas, le traitement par les extraits de plante a induit des phénomènes cytotoxiques avec nécrose cellulaire aux fortes doses et quelques phénomènes autophagiques minimes pour les doses faibles. Les résultats individuels sont

consignés tableau XVIII.

Les photos 4, 5 et 6 représentent une illustration de ce qui a pu être observé en microscopie électronique à transmission. Ces images permettent certains commentaires :

La photo 4 montre un hépatocyte témoin parfaitement bien conservé avec un noyau normal et une grande richesse cytoplasmique notamment en mitochondries et peu de figures lysosomiales.

La photo 5 montre un hépatocyte traité par l'extrait E 5141-3A à la dose de 5 mg de plante sèche/ml dans lequel apparaissent quelques signes de cytotoxicité sous la forme d'une rétraction de la cellule (diminution de la taille). Le noyau est un peu plus riche en chromatine condensée et l'on peut noter la présence de vésicules légèrement osmophiles de nature lipidique dans le cytoplasme.

La photo 5 montre un hépatocyte traité par l'extrait E 5141-3A à la dose de 20 mg de plante sèche/ml. La mort de l'hépatocyte se matérialise sous la forme d'un hépatocyte gonflé avec un noyau pycnotique. Le cytoplasme est vide d'organites et seules quelques microvésicules et rares macrovésicules de lipides persistent. La membrane plasmique est quasi totalement détruite.

Tableau XVII : EFFET DES EXTRAITS E 5141-3A ET RT 1096 SUR LA FUIITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.

Les extraits sont solubilisés et dilués dans le milieu de culture et les concentrations sont exprimées en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/ml (moyenne \pm écart type, n=3). Comparaison des moyennes (essai 1) par le test t de Student exact, (essai 2) par le test Student Welch : (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). Observations cytomorphologiques en microscopie optique inverse (M.O.I.) codée comme décrit paragraphe 341.

PRODUIT	DOSE	LDH	GPT	GOT	M.O.I.
TEMOIN		611 \pm 13	59 \pm 1	117 \pm 0	0
E 5141-3A	0,625	556 \pm 11	55 \pm 1	94 \pm 1	0
E 5141-3A	1,25	569 \pm 4	57 \pm 1	88 \pm 3	0
E 5141-3A	2,5	521 \pm 31	52 \pm 4	79 \pm 4	+
E 5141-3A	5	528 \pm 32	51 \pm 4	72 \pm 7	+
E 5141-3A	10	1022 \pm 26*	92 \pm 0*	115 \pm 1	++
E 5141-3A	20	1625 \pm 22**	130 \pm 4**	162 \pm 4	+++
RT 1096	0,625	651 \pm 95	65 \pm 9	111 \pm 16	+
RT 1096	1,25	742 \pm 131	75 \pm 14	124 \pm 24	+
RT 1096	2,5	575 \pm 87	56 \pm 10	84 \pm 16	+
RT 1096	5	571 \pm 93	54 \pm 12	82 \pm 16	+
RT 1096	10	498 \pm 16	35 \pm 4	66 \pm 2 *	++
RT 1096	20	666	51	85	++
TEMOIN		320 \pm 12	25 \pm 1	42 \pm 4	0
E 5141-3A	0,625	401 \pm 129	32 \pm 11	47 \pm 19	0
E 5141-3A	1,25	299 \pm 15	24 \pm 1	34 \pm 3 *	0
E 5141-3A	2,5	322 \pm 13	25 \pm 2	31 \pm 2 *	0
E 5141-3A	5	369 \pm 19 *	27 \pm 2	33 \pm 2 *	+
E 5141-3A	10	1344 \pm 43***	91 \pm 3***	112 \pm 4***	+++
E 5141-3A	20	1378 \pm 46***	94 \pm 3***	109 \pm 4***	+++
RT 1096	0,625	311 \pm 20	23 \pm 4	35 \pm 5	0
RT 1096	1,25	327 \pm 25	21 \pm 5	36 \pm 2	0
RT 1096	2,5	275 \pm 30	17 \pm 3	28 \pm 3	0
RT 1096	5	284 \pm 6 *	18 \pm 0**	28 \pm 2**	0
RT 1096	10	281 \pm 5 **	17 \pm 1***	26 \pm 2**	0
RT 1096	20	302 \pm 9	17 \pm 1***	29 \pm 1**	+

Dosage protéines témoin 2 : 5,0 \pm 0,7 mg/boite (n=6)

Tableau XVIII : OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION DE LA CYTOTOXICITE DES EXTRAITS E 5141-3A ET RT 1096 DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.

PRODUIT	DOSE	OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES		
		INCLUSIONS LYSOSOMIALES HETEROGENES	PHENOMENES AUTOPHAGIQUES	CADAVRES CELLULAIRES
TEMOIN		rare		
E 5141-3A	0,625			rare
E 5141-3A	1,25	+		rare
E 5141-3A	2,5	+	+	++
E 5141-3A	5	+	qq vés.lipid.	++
E 5141-3A	10	+	++	+++
E 5141-3A	20			++++
RT 1096	0,625			+
RT 1096	1,25			rare
RT 1096	2,5			rare
RT 1096	5	+	qq vés.lipid.	+
RT 1096	10	++	+	++
RT 1096	20	++	+	++

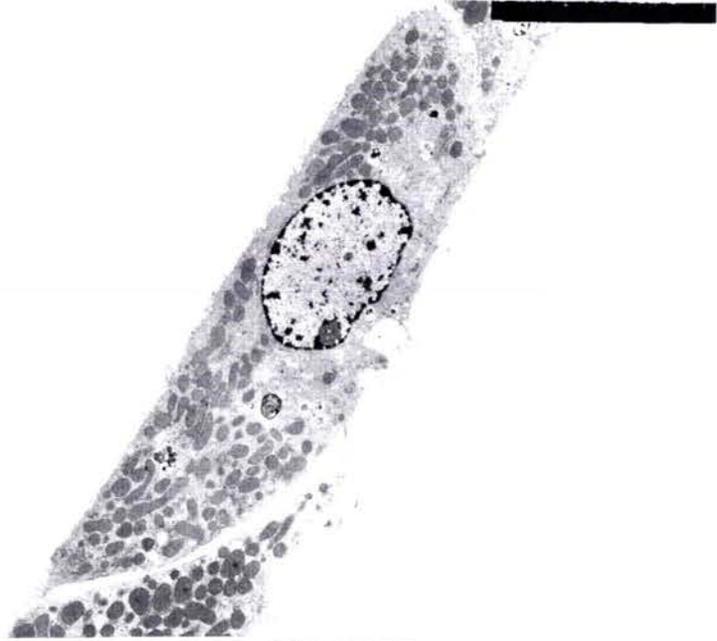


PHOTO 4 : HEPATOCYTE DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE
TEMOIN 24 HEURES

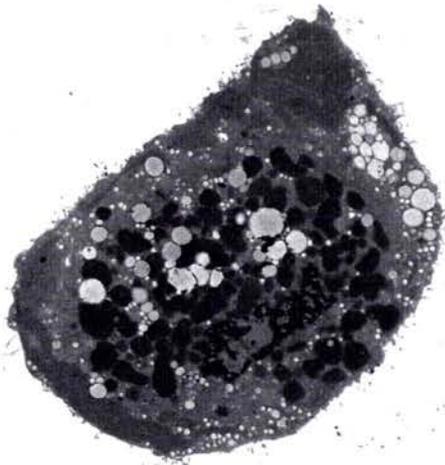


PHOTO 5 : HEPATOCYTE DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE
E 5141-3A 5mg PS/ml 24 HEURES

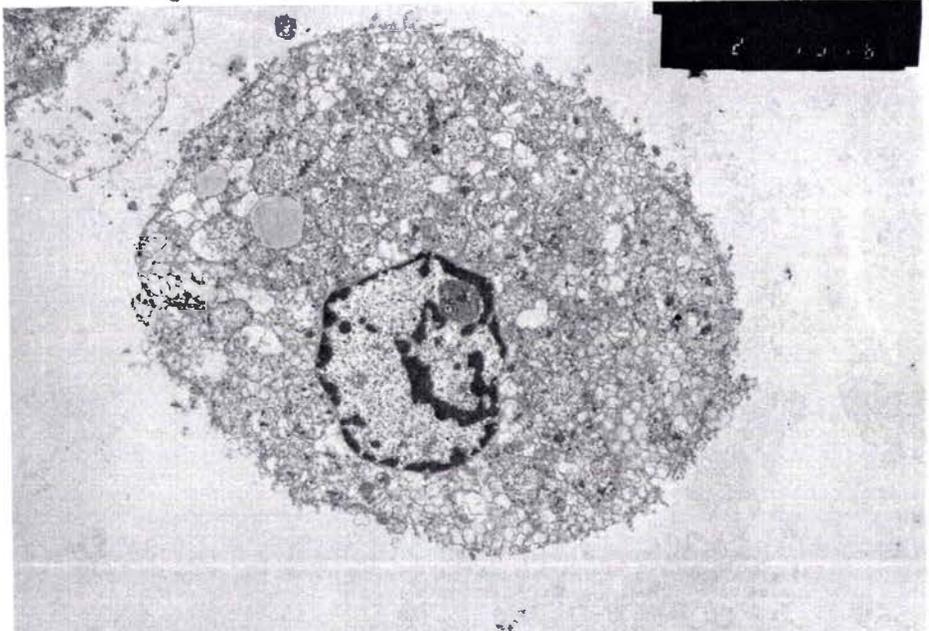


PHOTO 6 : HEPATOCYTE DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE
E 5141 3A 20 mg PS/ml 24 HEURES

42212. CYTOTOXICITE DE LA SILIMARINE.

Les hépatocytes de rat sont isolés comme décrit au paragraphe 3221 et la cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 32221 avec les conditions G.

Après un temps de traitement de 24 heures, l'activité des enzymes LDH, GPT et GOT libérées ainsi que les activités enzymatiques totales sont évaluées comme décrit au paragraphe 3322.

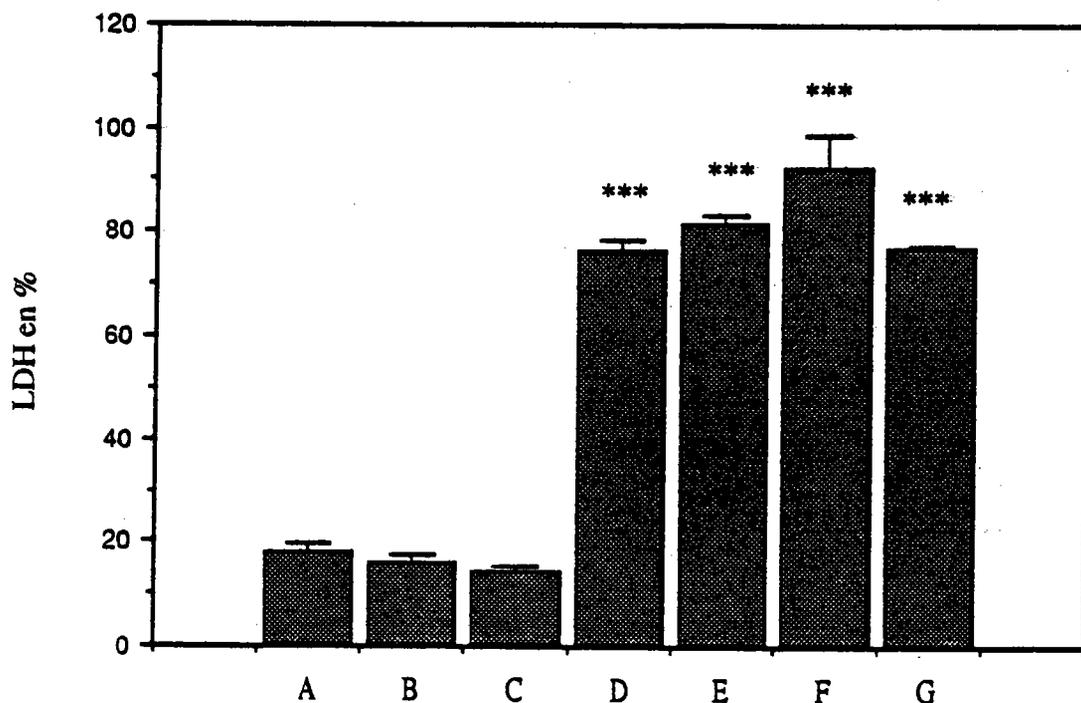
Les résultats présentés figure 23 et tableau XIX montrent que dans un premier essai réalisé sur une large gamme de concentrations (10 à 1000 ug/ml), la silymarine à la plus faible des doses testées (10 ug/ml) ne modifie pas la fuite de la LDH alors qu'elle entraîne une fuite importante de cette enzyme statistiquement significative à partir de la dose de 50 ug/ml comparé au lot témoin solvant. La diminution de la fuite de LDH à la dose de 1000 ug/ml comparé à la dose de 500 ug/ml peut être attribuée à un artéfact de dosage dû au produit testé. D'autre part, il est important de noter que le produit précipite aux 2 concentrations les plus élevées (500 et 1000 ug/ml).

L'observation des cellules au microscope optique inverse à contraste de phase a permis de constater la forte proportion de cellules en nécrose avec détachement du tapis cellulaire dès la dose de 50 ug/ml. Aux doses supérieures, pratiquement toutes les cellules sont mortes.

Les résultats présentés figure 24, 25 et 26 et tableau XIX montrent que dans un deuxième essai réalisé sur une gamme de concentrations plus faibles (5 à 50 ug/ml), la silymarine n'a pas modifié la fuite des enzymes LDH, GPT et GOT aux doses inférieures ou égales à 20 ug/ml alors qu'elle entraîne une fuite de ces enzymes statistiquement significative et dose dépendante pour les concentrations de produit supérieures à 30 ug/ml comparé au lot témoin solvant. Bien que statistiquement significative, la fuite de GOT reste très modérée puisqu'elle atteint au plus 12,7 %.

Il est ainsi possible de déterminer que la dose létale 50 (dose qui provoque 50 % de relargage enzymatique) se situe entre 40 et 50 ug/ml pour la LDH et la GPT.

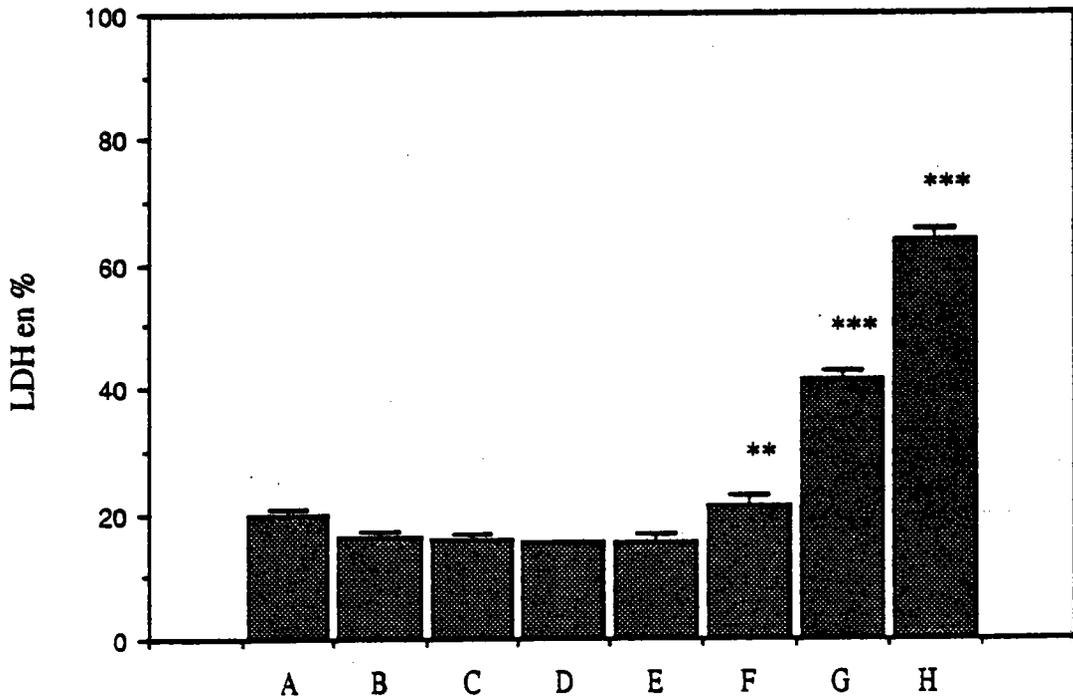
L'observation des cellules au microscope optique inverse à contraste de phase a permis de constater la présence d'un nombre important d'hépatocytes en nécrose avec détachement du tapis cellulaire à la dose de 50 ug/ml et un effet moindre à la dose de 40 ug/ml. La cytomorphologie des cultures traitées aux doses plus faibles est normale et en tout point comparable au lot témoin solvant.



A = Témoin
B = DMSO 1%
C = Silymarine 10 ug / ml
D = Silymarine 50 ug / ml
E = Silymarine 100 ug / ml
F = Silymarine 500 ug / ml
G = Silymarine 1000 ug / ml

Figure 23 : EFFET DE LA SILYMARINE SUR LA FUITE DE LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.

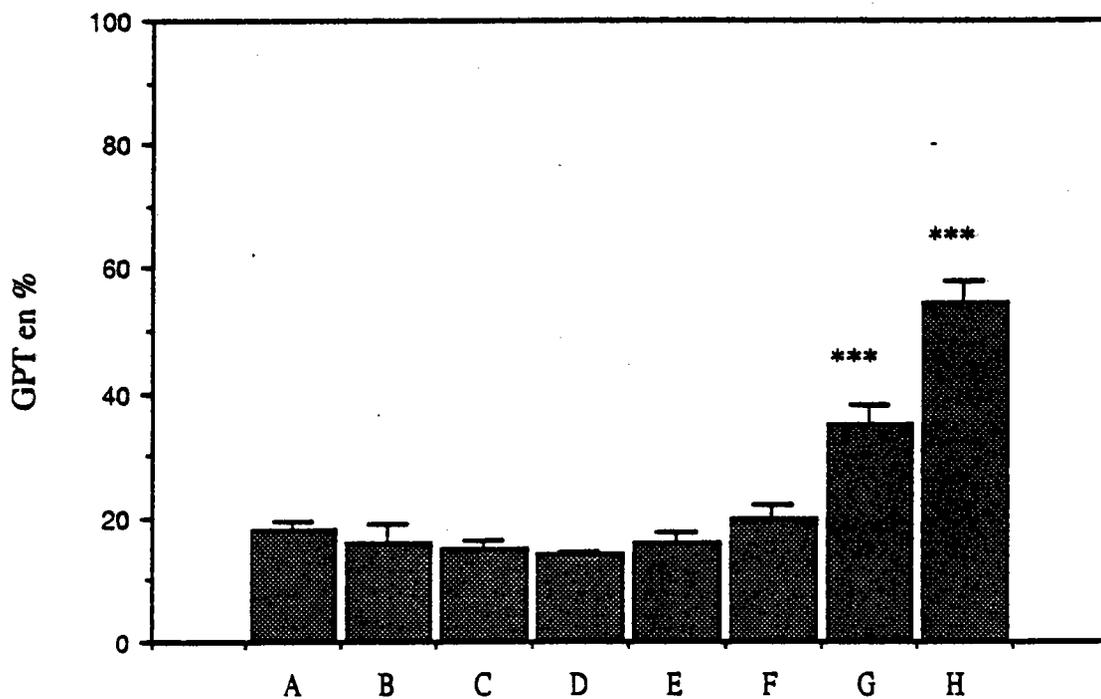
Après 2 heures d'attachement, les hépatocytes sont exposés à la silymarine solubilisée et diluée dans le DMSO et ajoutée aux cellules sous un volume de 1%. L'activité de la LDH libérée est exprimée en % (moyenne + écart type, n=3). Comparaison statistique des moyennes par le test t de Student exact (***) p < 0,001) le lot DMSO est pris comme référence.



- A = Témoin
- B = DMSO 1%
- C = Silymarine 5 ug / ml
- D = Silymarine 10 ug / ml
- E = Silymarine 20 ug / ml
- F = Silymarine 30 ug / ml
- G = Silymarine 40 ug / ml
- H = Silymarine 50 ug / ml

Figure 24 : EFFET DE LA SILYMARINE SUR LA FUIE DE LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.

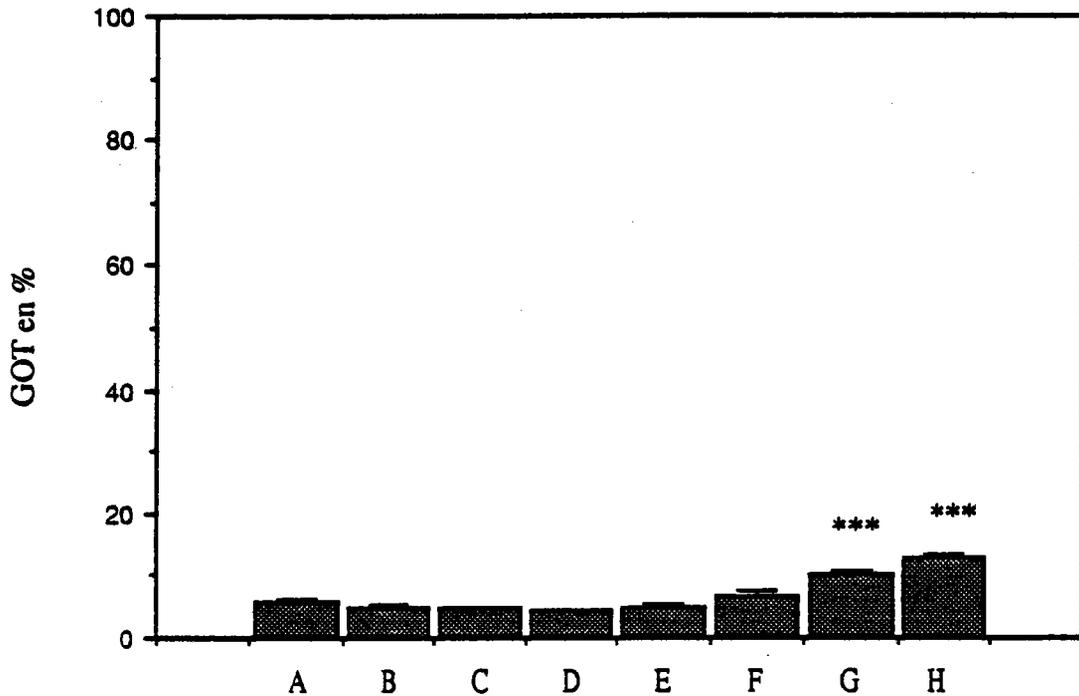
Après 2 heures d'attachement, les hépatocytes sont exposés à la silymarine solubilisée et diluée dans le DMSO et ajoutée aux cellules sous un volume de 1%. L'activité de la LDH libérée est exprimée en % (moyenne + écart type, n=3). Comparaison statistique des moyennes par le test t de Student exact (* p < 0,05; **, p < 0,01 *** p < 0,001) le lot DMSO est pris comme référence.



A = Témoin
B = DMSO 1%
C = Silymarine 5 ug / ml
D = Silymarine 10 ug / ml
E = Silymarine 20 ug / ml
F = Silymarine 30 ug / ml
G = Silymarine 40 ug / ml
H = Silymarine 50 ug / ml

Figure 25 : EFFET DE LA SILYMARINE SUR LA FUIE DE GPT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.

Après 2 heures d'attachement, les hépatocytes sont exposés à la silymarine solubilisée et diluée dans le DMSO et ajoutée aux cellules sous un volume de 1%. L'activité de la GPT libérée est exprimée en % (moyenne + écart type, n=3). Comparaison statistique des moyennes par le test t de Student exact (***) p < 0,001) le lot DMSO est pris comme référence.



- A = Témoin
- B = DMSO 1%
- C = Silymarine 5 ug / ml
- D = Silymarine 10 ug / ml
- E = Silymarine 20 ug / ml
- F = Silymarine 30 ug / ml
- G = Silymarine 40 ug / ml
- H = Silymarine 50 ug / ml

Figure 26 : EFFET DE LA SILYMARINE SUR LA FUITE DE GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.

Après 2 heures d'attachement, les hépatocytes sont exposés à la silymarine solubilisée et diluée dans le DMSO et ajoutée aux cellules sous un volume de 1%. L'activité de la GOT libérée est exprimée en % (moyenne + écart type, n=3). Comparaison statistique des moyennes par le test t de Student exact (* p < 0,05; *** p < 0,001) le lot DMSO est pris comme référence.

Tableau XIX : EFFET DE LA SILYMARINE SUR LA FUIITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE TRAITES DURANT 24 HEURES.

Après 2 heures d'attachement, les hépatocytes sont exposés à la silymarine solubilisée et diluée dans le DMSO et ajoutée aux cellules sous un volume de 1%. Les activités des enzymes libérées, déterminées dans 2 cultures issues de rats différents sont exprimées en % (moyenne \pm écart type, n=3). Comparaison statistique des moyennes par le test t de Student exact (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001) le lot DMSO est pris comme référence.

Observations cytomorphologiques en microscopie optique inverse (MOI) codée comme décrit paragraphe 341.

PRODUIT	DOSE ug/ml.	LDH %	GPT %	GOT %	MOI
TEMOIN	.	18,3 \pm 1,5	ND	ND	0
DMSO	.	15,8 \pm 1,7	ND	ND	0
Silymarine	10	14,2 \pm 1,4	ND	ND	0
Silymarine	50	76,4 \pm 2,2***	ND	ND	+++
Silymarine	100	81,7 \pm 1,5***	ND	ND	+++
Silymarine	500	92,2 \pm 6,3***	ND	ND	+++
Silymarine	1000	77,0 \pm 0,7***	ND	ND	+++
TEMOIN	.	19,8 \pm 0,8	18,0 \pm 1,4	5,9 \pm 0,3	0
DMSO	.	16,1 \pm 1,2	15,9 \pm 3,1	5,0 \pm 0,4	0
Silymarine	5	15,9 \pm 0,7	15,0 \pm 1,3	4,7 \pm 0,2	0
Silymarine	10	15,3 \pm 0,1	14,2 \pm 0,4	4,5 \pm 0,1	0
Silymarine	20	15,4 \pm 1,5	16,0 \pm 1,9	4,9 \pm 0,6	0
Silymarine	30	21,1 \pm 1,8**	19,9 \pm 2,3	6,5 \pm 1,1	0
Silymarine	40	41,4 \pm 1,5***	34,8 \pm 3,2***	10,2 \pm 0,2***	++
Silymarine	50	63,7 \pm 2,0***	54,3 \pm 3,8***	12,7 \pm 0,5***	++

4222. MICROMETHODE.

Les hépatocytes de rat sont isolés comme décrit au paragraphe 3221 et la cytotoxicité est évaluée comme décrit au paragraphe 3222.

Après un temps de traitement de 24 heures, la mesure de l'activité de l'enzyme LDH libérée et intracellulaire est évaluée comme décrit au paragraphe 3322; la coloration au Rouge Neutre comme décrit au paragraphe 334; la coloration au MTT comme décrit au paragraphe 335; le dosage des protéines totales comme décrit au paragraphe 3332 et le dosage de la synthèse d'albumine comme décrit au paragraphe 3361.

42221. CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT E 5141-3A.

La synthèse des résultats obtenus au moyen des différents dosages mis en oeuvre est consignée tableau XX. Chaque paramètre étudié fait l'objet d'une illustration graphique spécifique dans les figures 27, 28, 29, 30 et 31.

L'extrait E 5141-3A ne modifie pas la fuite de l'enzyme LDH aux concentrations inférieures ou égales à 2,5 mg de plante sèche/ml; la dose de 5 mg de plante sèche/ml entraîne une fuite modérée (16,6 %) alors que les doses supérieures provoquent des fuites enzymatiques très importantes (supérieures à 90 %) statistiquement significatives comparées au lot témoin non traité traduisant ainsi une atteinte de la membrane plasmique.

L'extrait E 5141-3A augmente significativement la prise de coloration du rouge neutre aux concentrations de 0,625 et 1,25 mg de plante sèche/ml. Il est sans effet à la dose de 2,5 mg de plante sèche/ml alors que les doses supérieures ou égales à 5 mg de plante sèche/ml diminuent de façon très significative la prise du colorant comparé au lot témoin non traité ce qui traduit une atteinte lysosomiale à partir de la dose de 5 mg de plante sèche/ml. La légère augmentation de densité optique qui peut être observée entre la dose de 10 et 20 mg de plante sèche/ml est attribuable à un début d'artéfact de lecture imputable à la coloration parasite qu'entraîne la présence de pigments végétaux dans l'extrait. Pour cette raison la réponse mesurée lorsque les hépatocytes sont traités avec 40 mg de plante sèche/ml n'est pas exploitable.

L'extrait E 5141-3A modifie la capacité de réduction des sels de tétrazolium (coloration au MTT) d'une manière similaire à ce qui est observé avec le rouge neutre ce qui traduit une atteinte des fonctions mitochondriales à partir de la dose de 5 mg de plante sèche/ml comparé au lot témoin non traité. Pour les mêmes raisons qu'avec le rouge neutre, la réponse mesurée lorsque les hépatocytes sont traités avec 40 mg de plante sèche/ml n'est pas exploitable.

L'extrait E 5141-3A entraîne une faible diminution de la quantité de protéines totales présente dans les micropuits de culture traités aux doses comprises entre 0,625 et 2,5 mg de plante sèche/ml (différences statistiquement significatives à 1,25 et 2,5 mg de plante sèche/ml mais biologiquement comparables au témoin non traité). En revanche, une nette diminution dose dépendante est mesurée lorsque les hépatocytes sont traités aux

concentrations supérieures à 2,5 mg de plante sèche/ml. Pour les mêmes raisons qu'avec le rouge neutre et le MTT, la réponse mesurée lorsque les hépatocytes sont traités avec 40 mg de plante sèche/ml n'est pas exploitable.

L'extrait E 5141-3A ne modifie pas la capacité de synthèse d'albumine des hépatocytes traités à la dose de 0,625 mg de plante sèche/ml. Une augmentation sensible est observée aux doses de 1,25 et 2,5 mg de plante sèche/ml alors qu'une franche diminution dose dépendante est mesurée dans les traitements aux concentrations supérieures ou égales à 5 mg de plante sèche/ml, statistiquement significative comparée au lot témoin non traité.

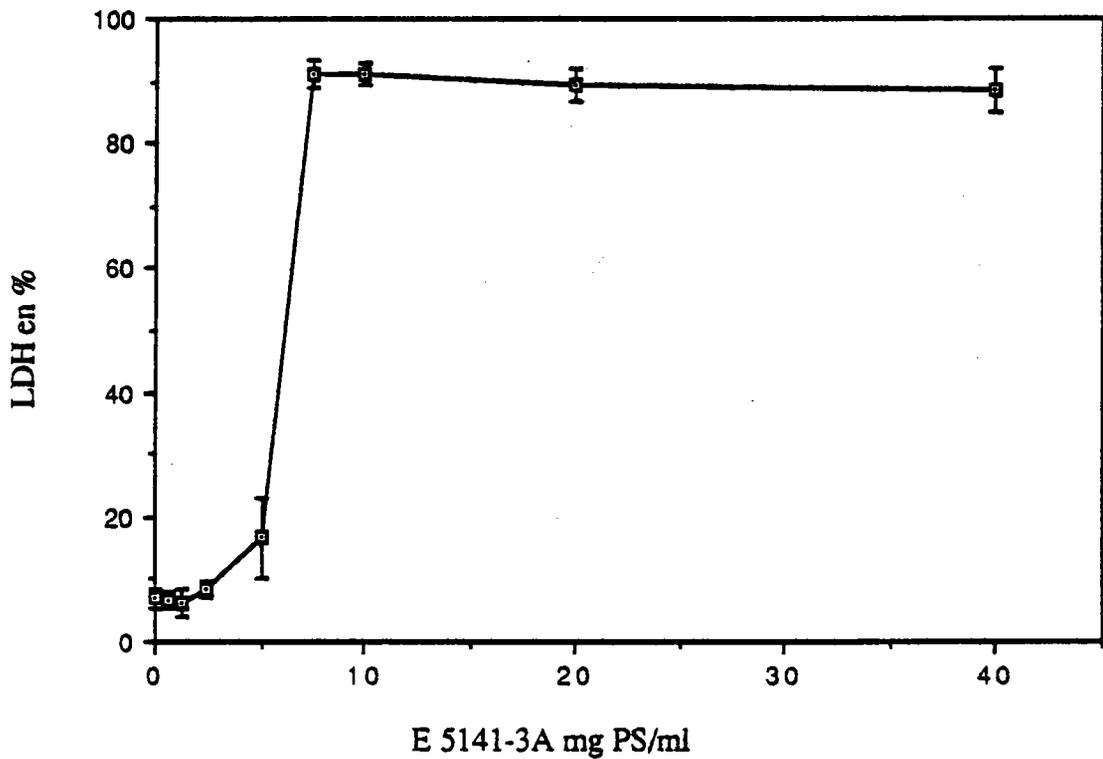


Figure 27 : EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUITE DE LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.
L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. L'activité de l'enzyme LDH libérée est exprimée en % de l'activité totale (moyenne \pm écart type). Comparaison des moyennes par le test de Student Welch (** p < 0,01; *** p < 0,001).

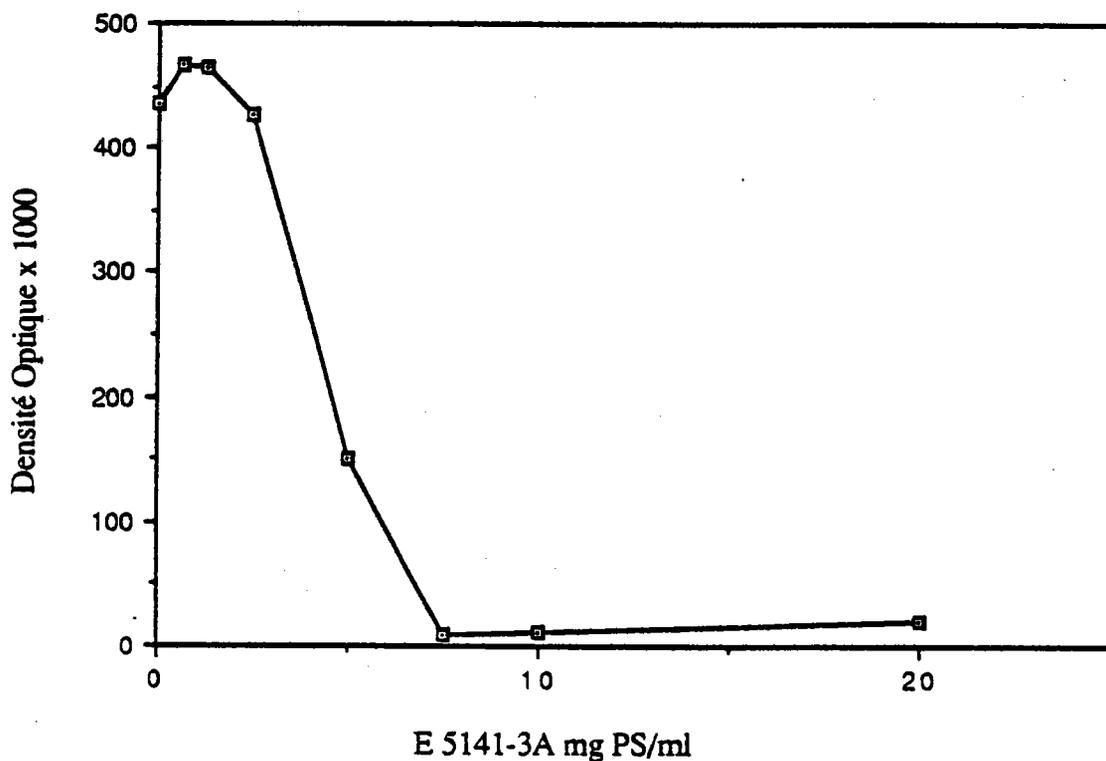


Figure 28 : EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA COLORATION DES LYSOSOMES PAR LE ROUGE NEUTRE DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. L'intensité de la coloration est exprimée en densité optique (moyenne \pm écart type). Comparaison des moyennes par le test de Student Welch (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

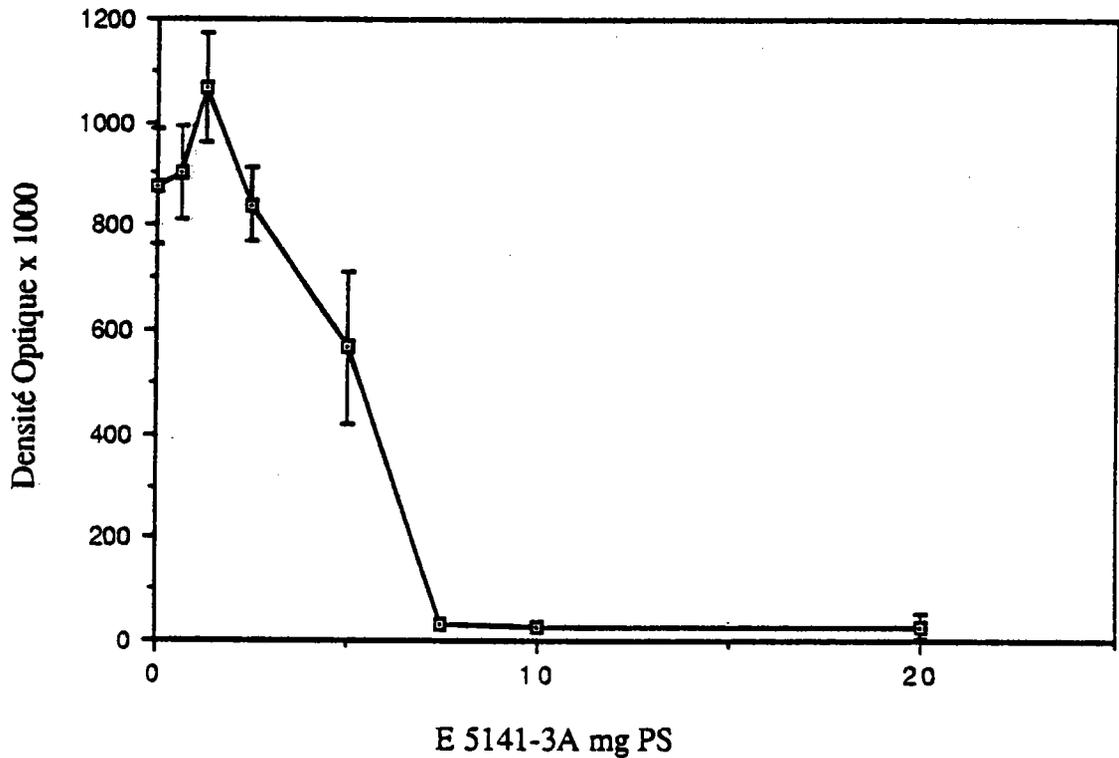


Figure 29 : EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA CAPACITE DE REDUCTION DU MTT PAR LES MITOCHONDRIES DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. L'intensité de la coloration est exprimée en densité optique (moyenne \pm écart type). Comparaison des moyennes par le test de Student Welch (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

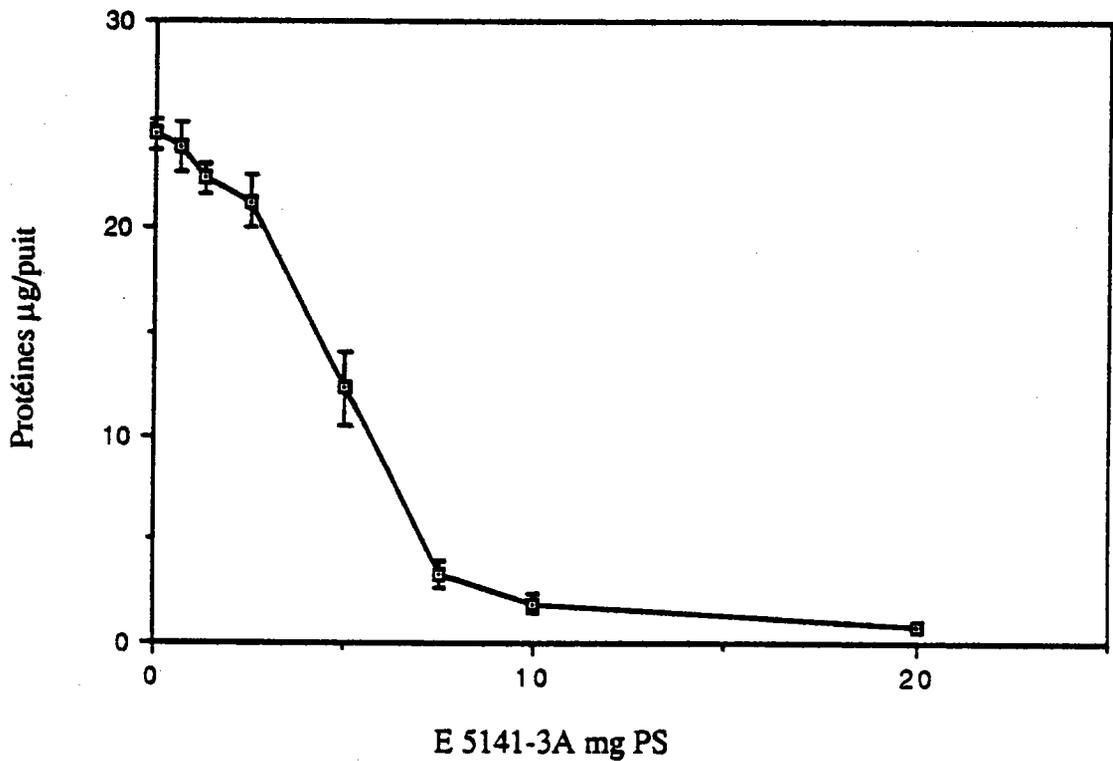


Figure 30 : EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA QUANTITE DE PROTEINES TOTALES DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. La quantité de protéines est exprimée en ug par puit (moyenne \pm écart type). Comparaison des moyennes par le test de Student Welch (***) $p < 0,001$.

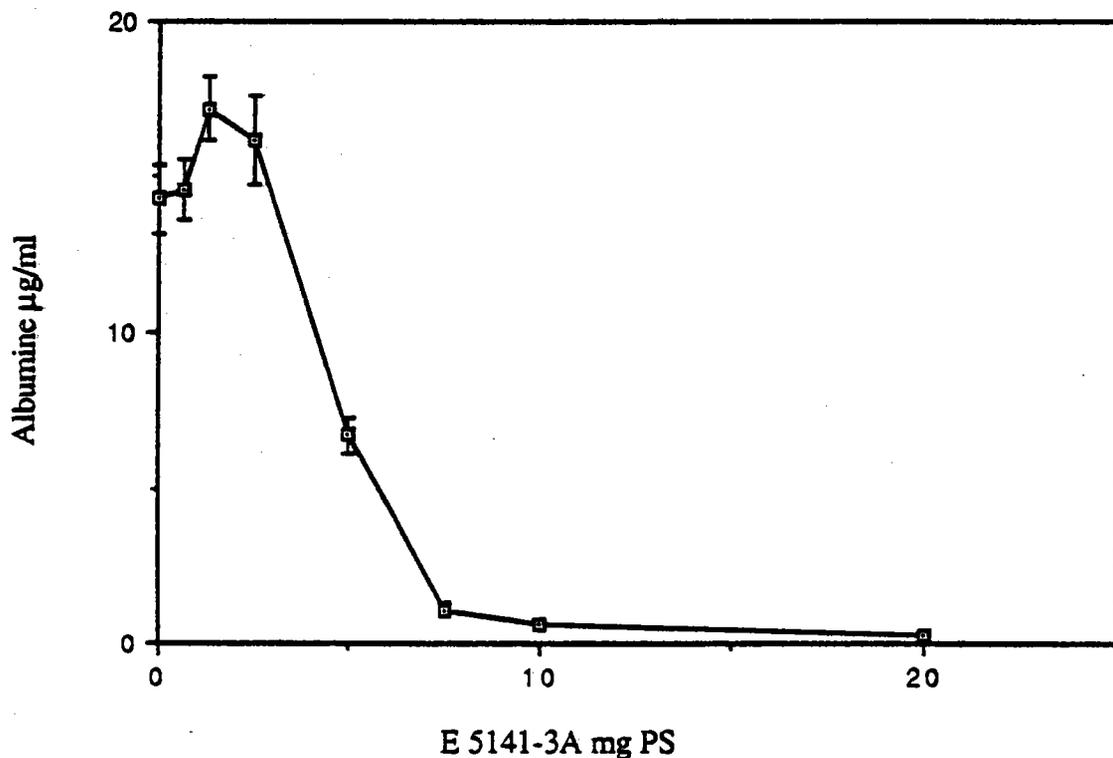


Figure 31 : EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA CAPACITE DE SYNTHÈSE D'ALBUMINE DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. La quantité d'albumine est exprimée en ug/ml (moyenne \pm écart type). Comparaison des moyennes par le test de Student Welch (* $p < 0,05$. *** $p < 0,001$).

Tableau XX : EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml.

L'activité de l'enzyme LDH libérée est exprimée en % de l'activité totale; les colorations au rouge neutre et au MTT en densité optique; la quantité de protéines totales en ug/puit et l'albumine sécrétée en ug/ml (moyenne \pm écart type). Comparaison des moyennes par le test de Student Welch (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

PRODUIT	DOSE	LDH	RN	MTT	PROTEINES	ALBUMINE
	ug/ml	%	DO x 1000	DO x 1000	ug / puit	ug / ml
TEMOIN		7,0 \pm 1,5	435 \pm 22	878 \pm 112	24,5 \pm 0,7	14,3 \pm 1,1
E 5141-3A	0,625	6,8 \pm 1,3	466 \pm 14 **	901 \pm 90	23,9 \pm 1,2	14,6 \pm 1,0
E 5141-3A	1,25	6,2 \pm 2,2	465 \pm 19 **	1067 \pm 107 **	22,4 \pm 0,7***	17,2 \pm 1,0***
E 5141-3A	2,5	8,5 \pm 1,3	426 \pm 26	841 \pm 73	21,3 \pm 1,3***	16,2 \pm 1,4 *
E 5141-3A	5	16,6 \pm 6,3 **	150 \pm 26***	566 \pm 146***	12,3 \pm 1,8***	6,7 \pm 0,6***
E 5141-3A	7,5	91,1 \pm 2,2***	9 \pm 3 ***	31 \pm 7 ***	3,3 \pm 0,7***	1,1 \pm 0,2***
E 5141-3A	10	91,2 \pm 1,7***	11 \pm 4 ***	27 \pm 6 ***	1,9 \pm 0,5***	0,6 \pm 0,2***
E 5141-3A	20	89,5 \pm 2,7***	19 \pm 2 ***	28 \pm 24 ***	0,8 \pm 0,1***	0,3 \pm 0,1***
E 5141-3A	40	88,5 \pm 3,6***	PT	PT	PT	ND
n / lot		8	8	8	7	6

42222. CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT RT 1096.

La synthèse des résultats obtenus au moyen des différents dosages mis en oeuvre est consignée tableau XXI. Chaque paramètre étudié fait l'objet d'une illustration graphique spécifique dans les figures 32, 33, 34, 35 et 36.

L'extrait RT 1096 ne modifie pas la fuite de l'enzyme LDH aux concentrations inférieures ou égales à 2,5 mg de plante sèche/ml. La concentration de 5 mg de plante sèche/ml provoque une légère augmentation du relargage de l'enzyme (22,0 %). Après un plateau à 30 % de relargage observé aux doses de 7,5 et 10 mg de plante sèche/ml, la fuite de LDH augmente ensuite proportionnellement à la dose pour atteindre la valeur de 89,3 % lorsque les hépatocytes sont traités avec 40 mg de plante sèche/ml; ces variations sont statistiquement différentes du lot témoin non traité et traduisent une atteinte majeure de la membrane plasmique.

L'extrait RT 1096 ne modifie pas la coloration par le rouge neutre aux doses inférieures ou égales à 2,5 mg de plante sèche/ml. Une diminution régulière de la densité optique, dose dépendante et statistiquement significative, est ensuite mesurée lorsque les hépatocytes sont traités avec des doses croissantes de produit, ce qui traduit une atteinte lysosomiale. La densité optique donc la coloration prend une valeur minimale quand les cellules sont traitées avec 20 mg de plante sèche/ml; la petite augmentation visible entre la dose de 20 et 40 mg de plante sèche/ml est due à une interférence des pigments végétaux contenus dans l'extrait RT 1096.

Dans le test au MTT, une augmentation des densités optiques est mesurée lorsque les hépatocytes sont traités par le RT 1096 à partir de la concentration la plus faible (0,625 mg de plante sèche/ml) jusqu'à la concentration de 10 mg de plante sèche/ml; ces différences sont statistiquement significatives comparé au lot témoin non traité. Une nette diminution de la densité optique, dose dépendante et statistiquement significative est mesurée lorsque les cellules ont été traitées avec des doses supérieures à 10 mg de plante sèche/ml.

Aucune modification de la quantité de protéines totales présente dans les micropuits de culture n'est observée lorsque les hépatocytes sont traités avec le RT 1096 à des doses inférieures à 10 mg de plante sèche/ml. En revanche, le dosage révèle de nettes baisses des taux de protéines pour les concentrations supérieures à cette valeur seuil de 10 mg de plante sèche/ml; les différences sont statistiquement significatives comparé au lot témoin non traité.

Le dosage de l'albumine montre une décroissance régulière de la synthèse de cette protéine spécifique en fonction de la dose de RT 1096 administrée; les différences sont statistiquement significatives dès la concentration de 1,25 mg de plante sèche/ml.

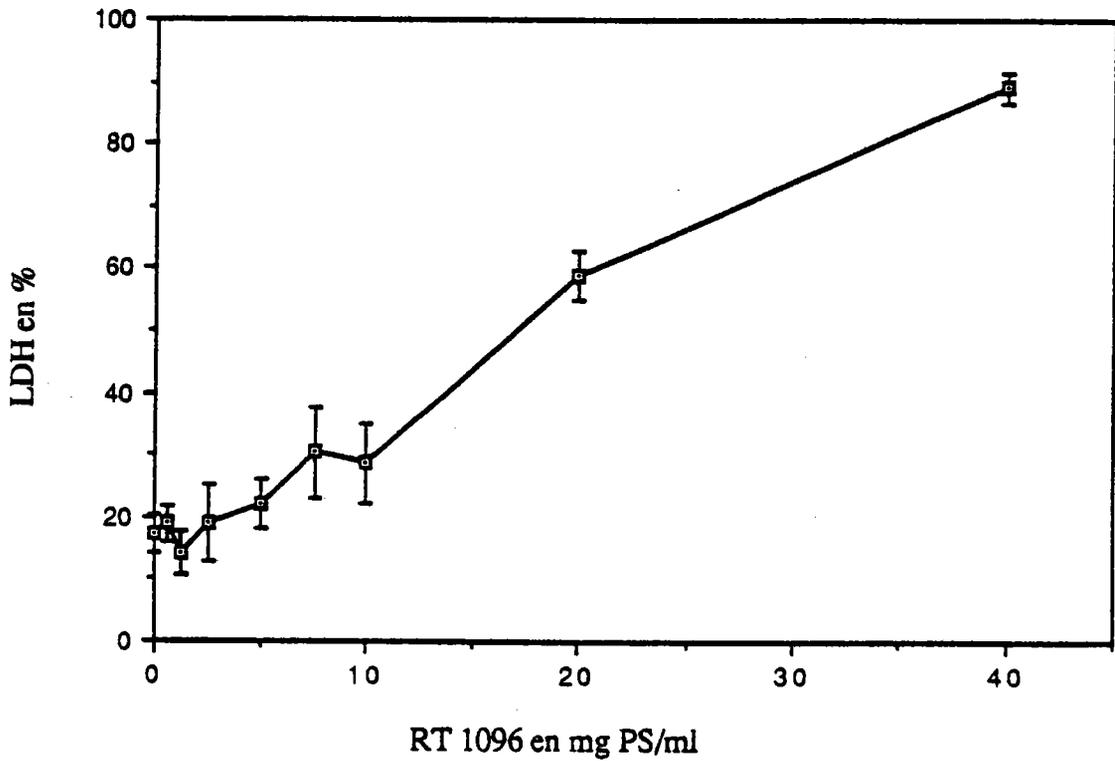


Figure 32 : EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUITE DE LDH DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. L'activité de l'enzyme LDH libérée est exprimée en % de l'activité totale (moyenne \pm écart type). Comparaison des moyennes par le test de Student Welch (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

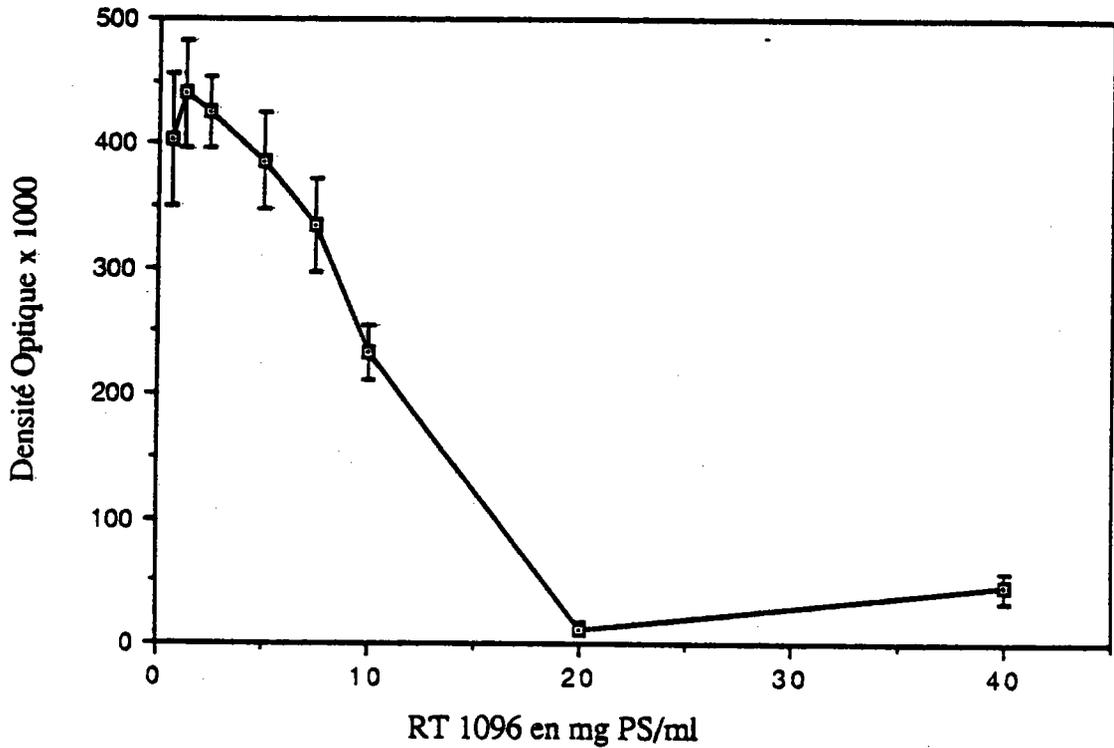


Figure 33 : EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA COLORATION DES LYSOSOMES PAR LE ROUGE NEUTRE DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. L'intensité de la coloration est exprimée en densité optique (moyenne \pm écart type). Comparaison des moyennes par le test de Student Welch (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

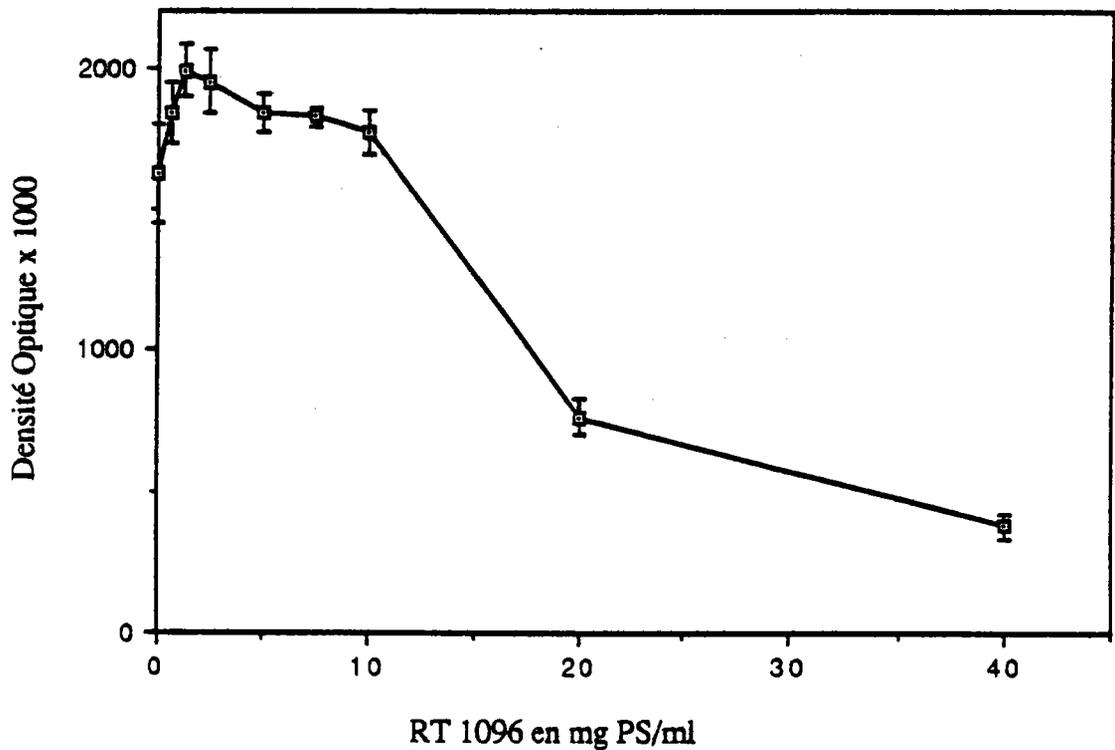


Figure 34 : EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA CAPACITE DE REDUCTION DU MTT PAR LES MITOCHONDRIES DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. L'intensité de la coloration est exprimée en densité optique (moyenne \pm écart type). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe (* risque $< 0,05$; *** risque $< 0,001$).

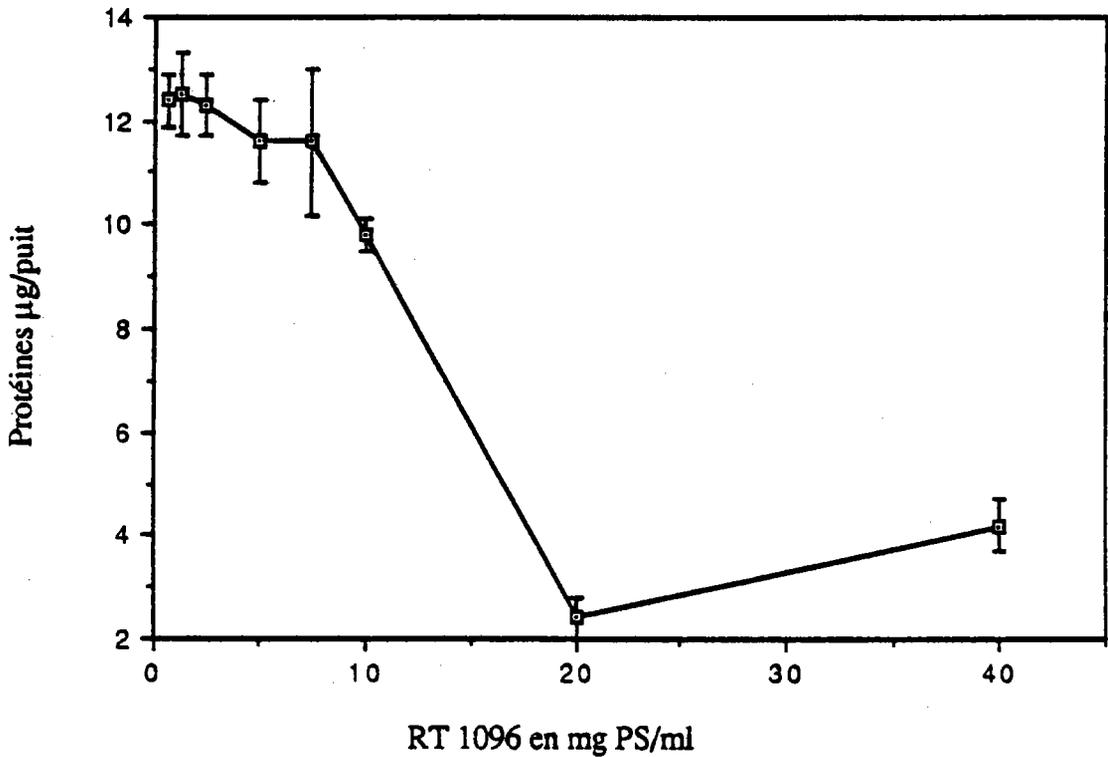


Figure 35 : EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA QUANTITE DE PROTEINES TOTALES DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. La quantité de protéines est exprimée en ug par puit (moyenne \pm écart type). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe (***) risque $< 0,001$).

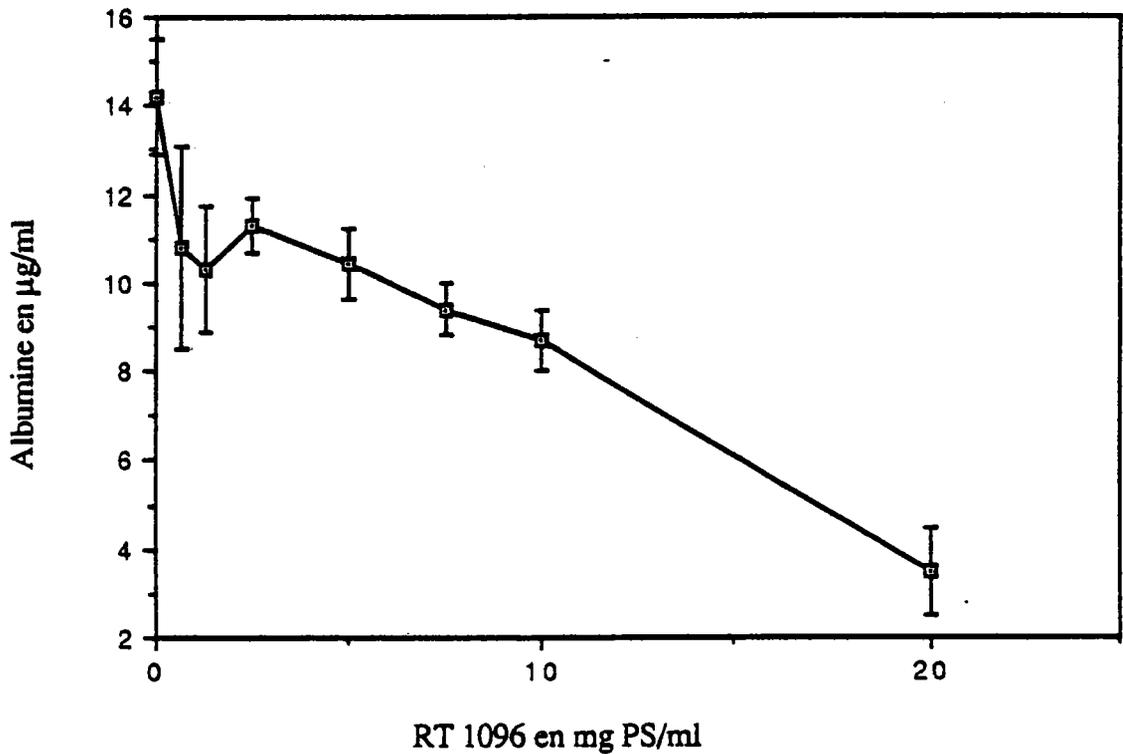


Figure 36 : EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA CAPACITE DE SYNTHÈSE D'ALBUMINE DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. La quantité d'albumine est exprimée en ug/ml (moyenne \pm écart type). Comparaison des moyennes par le test de Student Welch (** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$).

Tableau XXI : EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN MICROMETHODE TRAITES DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml.

L'activité de l'enzyme LDH libérée est exprimée en % de l'activité totale; les colorations au rouge neutre et au MTT en densité optique; la quantité de protéines totales en ug/puit et l'albumine sécrétée en ug/ml (moyenne ± écart type). Comparaison des moyennes par le test de Student Welch (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001) pour la LDH, le rouge neutre et l'albumine. Comparaison des moyennes par le test de Scheffe (* risque < 0,05; ** risque < 0,01) pour le MTT et les protéines.

PRODUIT	DOSE	LDH	RN	MTT	PROTEINES	ALBUMINE
		%	DO x 1000	DO x 1000	ug / puit	ug / ml
TEMOIN		17,2 ± 3,0	439 ± 41	1630 ± 175	12,7 ± 0,6	14,2 ± 1,3
RT 1096	0,625	18,9 ± 3,0	403 ± 53	1839 ± 105 *	12,4 ± 0,5	13,8 ± 2,3
RT 1096	1,25	14,1 ± 3,4	440 ± 43	1987 ± 92 ***	12,5 ± 0,8	10,3 ± 1,4***
RT 1096	2,5	19,0 ± 6,3	425 ± 28	1950 ± 111***	12,3 ± 0,6	11,3 ± 0,6 **
RT 1096	5	22,0 ± 3,9 *	386 ± 39 *	1839 ± 70 *	11,6 ± 0,8	10,4 ± 0,8***
RT 1096	7,5	30,4 ± 7,4 **	335 ± 37***	1827 ± 36 *	11,6 ± 1,4	9,4 ± 0,6***
RT 1096	10	28,6 ± 6,5***	234 ± 22***	1772 ± 78	9,8 ± 0,3***	8,7 ± 0,7***
RT 1096	20	58,8 ± 4,1***	12 ± 5 ***	764 ± 62 ***	2,4 ± 0,4***	3,5 ± 1,0***
RT 1096	40	89,3 ± 2,4***	46 ± 12***	375 ± 44 ***	4,2 ± 0,5***	ND
n / lot		8	8	8	7	6

423. HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE.

Les hépatocytes humains sont isolés comme décrit au paragraphe 3231 et mis en culture pour les tests de cytotoxicité comme décrit au paragraphe 3232 avec les conditions B.

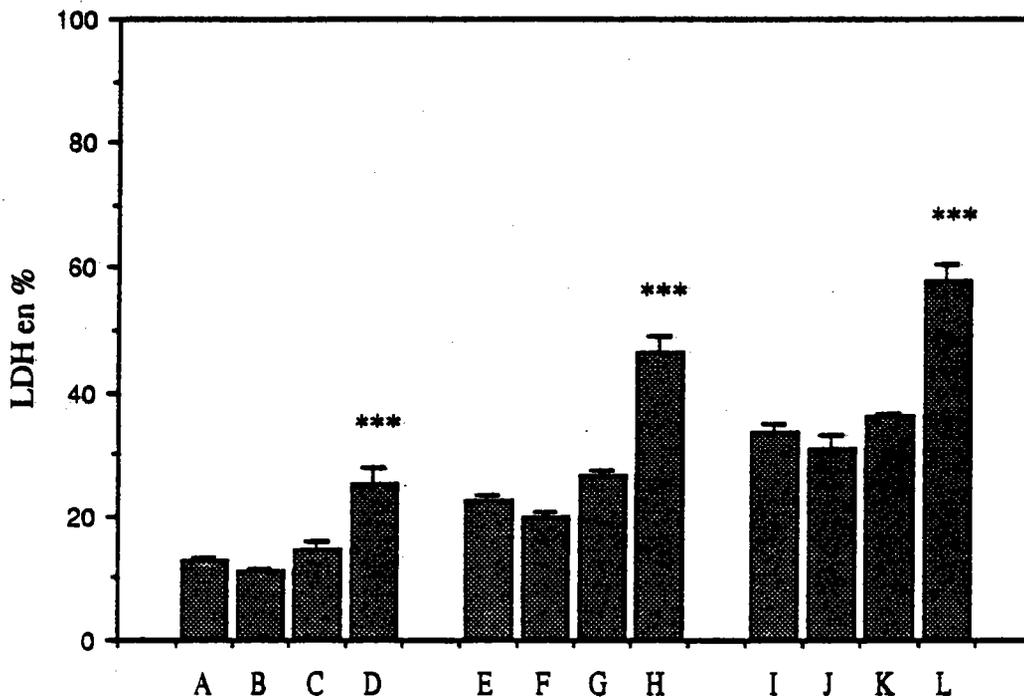
4231. CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT E 5141-3A.

Après un temps de traitement de 24 heures, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais sans extrait de plante. Aux temps 24, 48 et 72 heures la mesure de l'activité des enzymes LDH, GPT et GOT libérées ainsi que les activités enzymatiques totales sont évaluées comme décrit au paragraphe 3322. L'observation cytomorphologique des cellules est effectuée comme décrit au paragraphe 341.

Les résultats présentés figures 37 et 38 et tableau XXII montrent qu'au temps 24 heures on observe une légère diminution de la fuite des enzymes LDH et GPT pour le lot traité à la dose de 2,5 mg de plante sèche/ml et une légère augmentation pour le lot traité à la dose de 5 mg de plante sèche/ml comparé au lot témoin non traité; ces différences ne sont pas statistiquement significatives. En revanche, une nette augmentation de la fuite de ces enzymes, statistiquement significative, est observée lorsque les hépatocytes sont traités avec 10 mg de plante sèche/ml. Ces commentaires sont transposables aux temps 48 et 72 heures.

Les résultats présentés figure 39 et tableau XXII ne montrent pratiquement aucune variation de la fuite de l'enzyme GOT entre le lot témoin et les lots traités, quelque soit la dose administrée. De même, aucune modification n'apparaît ni au temps 48 heures ni au temps 72 heures si ce n'est l'augmentation naturelle de la fuite enzymatique au cours du temps, beaucoup plus élevée que la LDH et la GPT.

L'observation cytomorphologique des cultures au microscope optique inverse à contraste de phase révèle au temps 24 heures un début de nécrose d'une proportion importante des cellules traitées à la plus forte dose (10 mg de plante sèche/ml) qui évolue vers une nécrose généralisée à l'ensemble du tapis cellulaire après 48 et 72 heures de culture. A la dose intermédiaire de 5 mg de plante sèche/ml on observe quelques phénomènes d'altération cellulaire (inclusions cytoplasmiques et rétraction hépatocytaire) alors que les cultures traitées à la dose de 2,5 mg de plante sèche/ml sont morphologiquement comparables au lot témoin non traité.



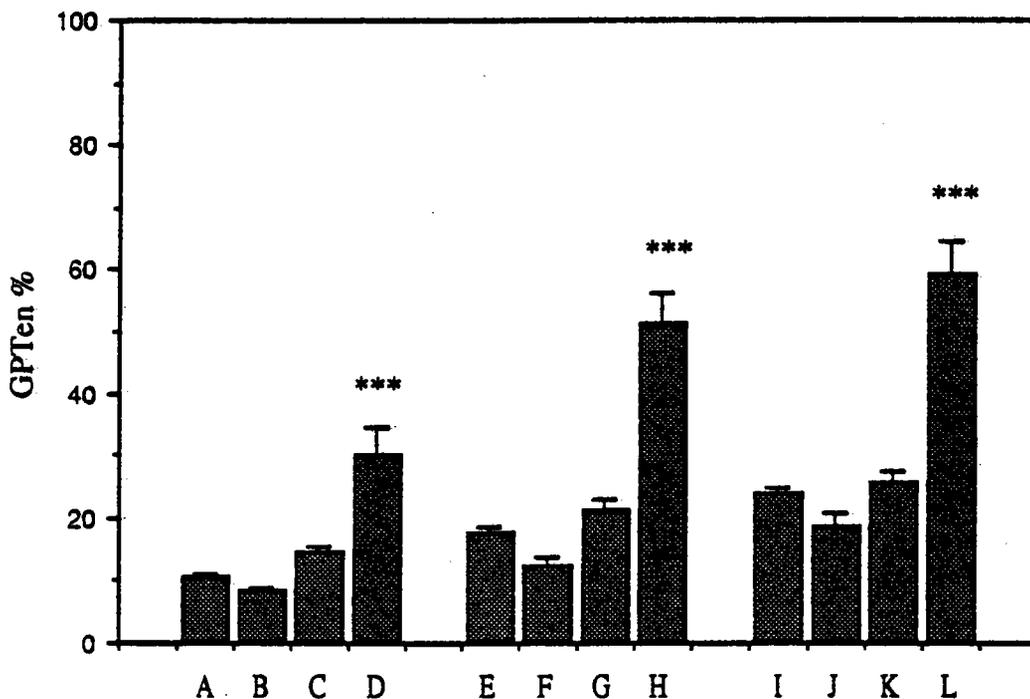
Temps 24 heures A = Témoin
B = 2,5 mg PS / ml
C = 5 mg PS / ml
D = 10 mg PS / ml

Temps 48 heures E = Témoin
F = 2,5 mg PS / ml
G = 5 mg PS / ml
H = 10 mg PS / ml

Temps 72 heures I = Témoin
J = 2,5 mg PS / ml
K = 5 mg PS / ml
L = 10 mg PS / ml

Figure 37 : EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUITE DE LDH DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. Après 24 heures de traitement, le milieu est remplacé par du milieu sans extrait de plante. Les activités enzymatiques sont exprimées en % de l'activité totale (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe (***) risque < 0,001).



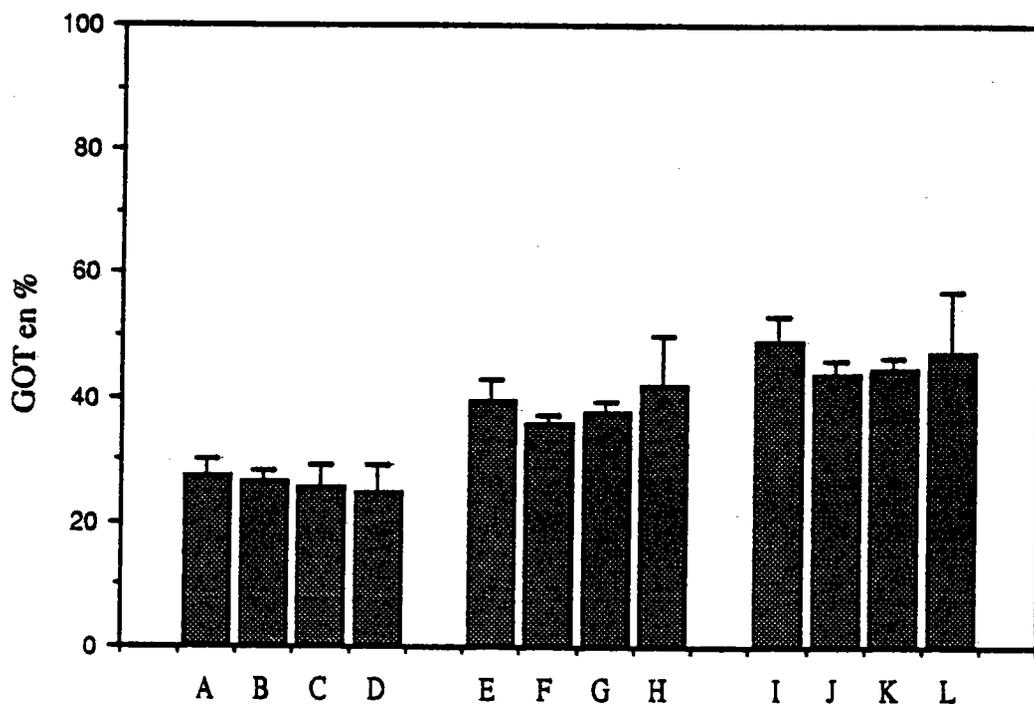
Temps 24 heures A = Témoin
B = 2,5 mg PS / ml
C = 5 mg PS / ml
D = 10 mg PS / ml

Temps 48 heures E = Témoin
F = 2,5 mg PS / ml
G = 5 mg PS / ml
H = 10 mg PS / ml

Temps 72 heures I = Témoin
J = 2,5 mg PS / ml
K = 5 mg PS / ml
L = 10 mg PS / ml

Figure 38 : EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUITE DE GPT DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. Après 24 heures de traitement, le milieu est remplacé par du milieu sans extrait de plante. Les activités enzymatiques sont exprimées en % de l'activité totale (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe (***) risque < 0,001).



Temps 24 heures A = Témoin
B = 2,5 mg PS / ml
C = 5 mg PS / ml
D = 10 mg PS / ml
Temps 48 heures E = Témoin
F = 2,5 mg PS / ml
G = 5 mg PS / ml
H = 10 mg PS / ml
Temps 72 heures I = Témoin
J = 2,5 mg PS / ml
K = 5 mg PS / ml
L = 10 mg PS / ml

Figure 39 : EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUIITE DE GOT DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. Après 24 heures de traitement, le milieu est remplacé par du milieu sans extrait de plante. Les activités enzymatiques sont exprimées en % de l'activité totale (moyenne + écart type). L'analyse de variance ne montre pas de différence significative.

Tableau XXII : EFFET DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUIE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. Après 24 heures de traitement, le milieu est remplacé par du milieu sans extrait de plante. Les activités enzymatiques sont exprimées en % de l'activité totale (moyenne \pm écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe (***) risque < 0,001).

TEMPS	DOSE	LDH %	GPT %	GOT %
24 Heures	0	12,7 \pm 0,4	10,4 \pm 0,7	27,3 \pm 2,6
	2,5	10,9 \pm 0,4	8,4 \pm 0,5	26,4 \pm 1,7
	5	14,4 \pm 1,4	14,4 \pm 1,1	25,7 \pm 3,6
	10	25,1 \pm 2,7***	29,9 \pm 4,5***	24,9 \pm 4,1
48 Heures	0	22,5 \pm 0,8	17,6 \pm 1,1	39,4 \pm 3,5
	2,5	19,7 \pm 1,2	12,6 \pm 0,9	35,8 \pm 1,4
	5	26,5 \pm 1,1	21,4 \pm 1,8	37,8 \pm 1,6
	10	46,3 \pm 2,9***	51,5 \pm 4,8***	42,0 \pm 7,8
72 Heures	0	33,8 \pm 1,2	24,0 \pm 0,9	49,0 \pm 3,9
	2,5	30,9 \pm 2,3	18,8 \pm 1,8	43,7 \pm 2,1
	5	36,1 \pm 0,8	25,8 \pm 1,6	44,6 \pm 1,7
	10	58,0 \pm 2,6***	59,1 \pm 5,6***	47,3 \pm 9,8

4232. CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT RT 1096.

Après un temps de traitement de 24 heures, la mesure de l'activité des enzymes LDH, GPT et GOT libérées ainsi que les activités enzymatiques totales sont évaluées comme décrit au paragraphe 3322. L'observation cytomorphologique des cellules est effectuée comme décrit au paragraphe 341.

Les résultats présentés figures 40, 41 et 42 et tableau XXIII montrent que l'extrait RT 1096 ne modifie pas la fuite de ces trois enzymes lorsque les cellules sont traitées avec la plus faible des concentrations (1 mg de plante sèche/ml). Aux doses supérieures, l'extrait n'entraîne que de faibles variations du relargage des enzymes mesurées et toutes ces variations vont dans le sens d'une diminution de la fuite naturelle de ces enzymes, les différences sont statistiquement significatives pour la LDH et la GOT comparé au lot témoin non traité. Une seule valeur fait exception dans le cas de la mesure de la fuite de la GPT quand les hépatocytes sont traités à la dose de 20 mg de plante sèche/ml mais sans significativité statistique.

L'observation cytomorphologique des cultures au microscope optique inversé à contraste de phase montre cependant quelques légers signes de souffrance cellulaire à forte dose.

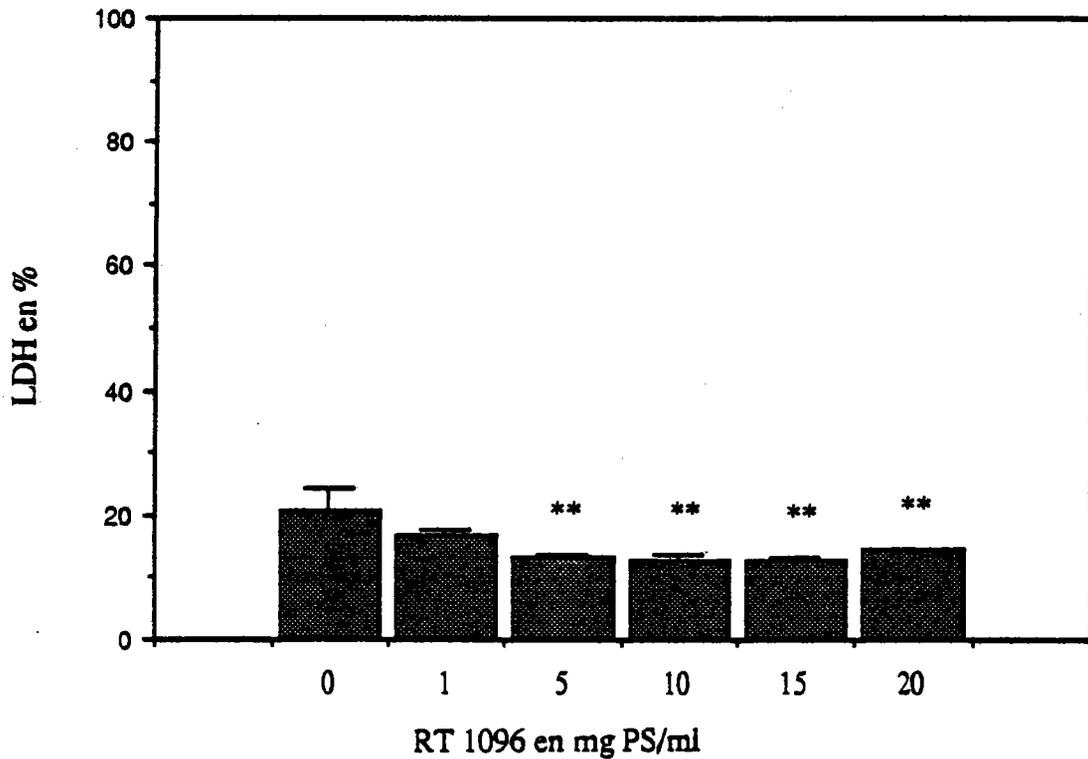


Figure 40 : EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUIE DE LDH DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en % de l'activité totale (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe (** risque < 0,01, *** risque < 0,001).

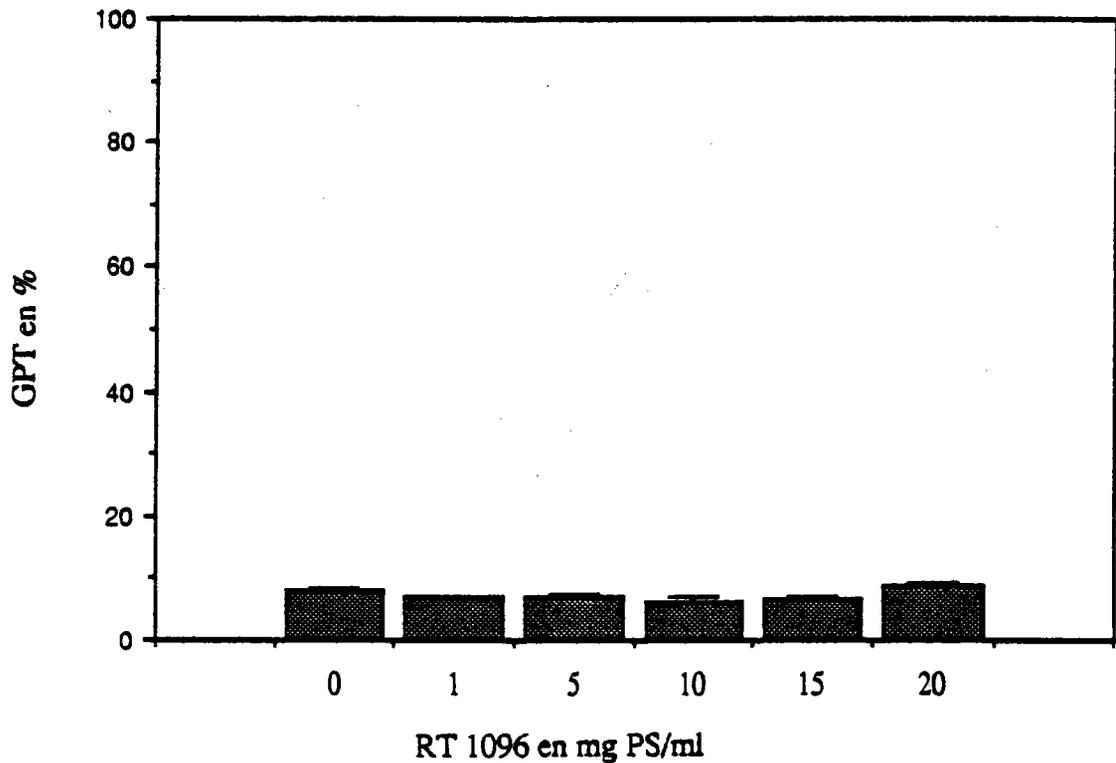


Figure 41 : EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUIE DE GPT DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en % de l'activité totale (moyenne + écart type, n=3). L'analyse de variance ne révèle pas de différences significatives entre les lots.

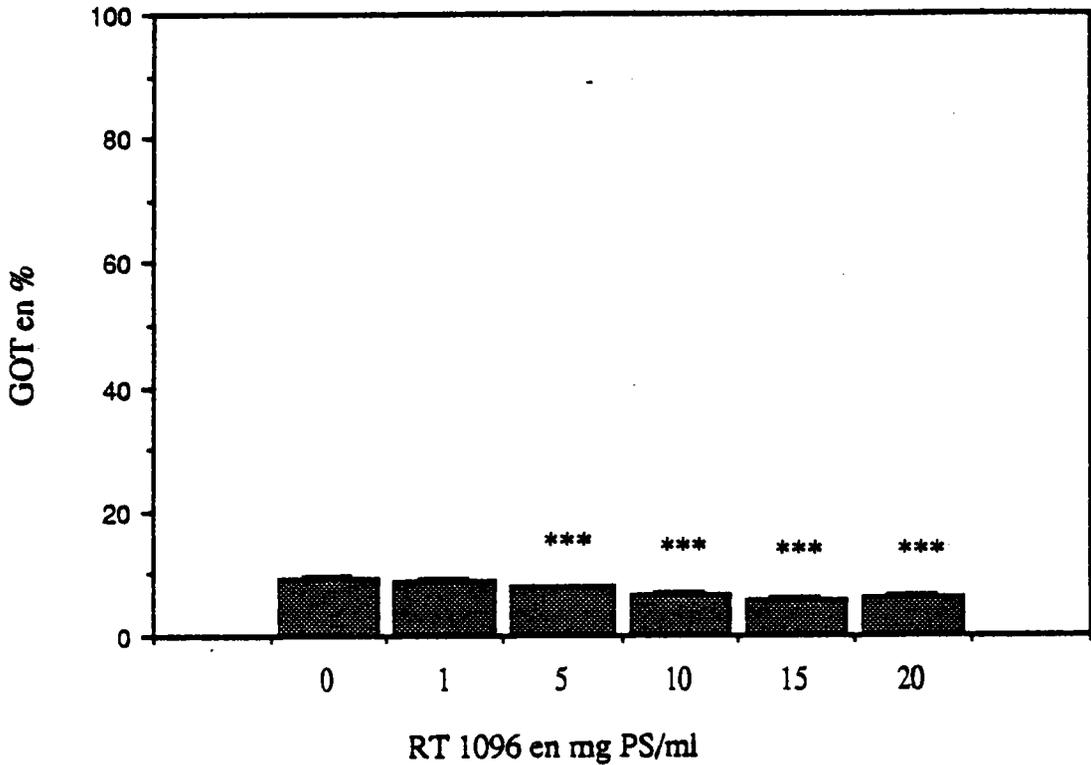


Figure 42 : EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUITE DE GOT DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en % de l'activité totale (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe (***) risque < 0,001).

Tableau XXIII : EFFET DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUIITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 24 HEURES.

L'extrait est solubilisé et dilué dans le milieu de culture et les concentrations exprimées en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en % de l'activité totale (moyenne \pm écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe (** risque < 0,01, *** risque < 0,001).

TEMPS	DOSE	LDH %	GPT %	GOT %
24 heures	0	21,0 \pm 3,4	7,9 \pm 0,5	9,3 \pm 0,3
	1	16,7 \pm 1,1	7,1 \pm 0,2	8,9 \pm 0,3
	5	13,2 \pm 0,7 **	7,2 \pm 0,5	7,8 \pm 0,1***
	10	13,0 \pm 0,8 **	6,4 \pm 0,5	6,5 \pm 0,4***
	15	13,0 \pm 0,3 **	6,7 \pm 0,5	5,9 \pm 0,1***
	20	14,4 \pm 0,2 **	8,8 \pm 0,7	6,3 \pm 0,2***

43. INFLUENCE DES EXTRAITS D'*Eupatorium cannabinum* L. SUR LA
CYTOTOXICITE DE 2 PRODUITS DE REFERENCE :
LE TETRACHLORURE DE CARBONE ET LA D-GALACTOSAMINE.

A partir des essais présentés dans la partie 41, les conditions d'intoxication des hépatocytes par le tétrachlorure de carbone (CCl₄), permettant d'apprécier une action spécifique du toxique de référence en minimisant l'effet du tiers solvant, ont été définies. Dans cette même partie, des conditions adaptées à l'intoxication des hépatocytes en culture primaire par la D-galactosamine ont été également définies.

Dans ce chapitre, sont présentés les résultats que nous avons obtenus pour tenter d'éprouver *in vitro* les potentialités hépatotropes de 2 extraits aqueux d'*Eupatorium cannabinum* L. (E 5141-3A et RT 1096) sur plusieurs modèles d'hépatocytes en culture.

431. HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION.

Les hépatocytes de rat sont isolés comme décrit au paragraphe 3211. La mesure de l'activité des enzymes libérées est évaluées comme décrit au paragraphe 3321.

4311. INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA TOXICITE DU
CCl₄ EN TRAITEMENT SIMULTANE DURANT 30 MINUTES.

Le protocole suivi est décrit au paragraphe 3241 avec les conditions A.

Les résultats présentés tableau XXIV montrent que par rapport à une augmentation de la fuite des enzymes LDH, GPT et GOT assez modeste mais cependant statistiquement significative qu'a provoqué le CCl₄ comparé au témoin DMSO, l'extrait E 5141-3A testé à la concentration de 2,5 mg de plante sèche/ml, a limité partiellement la fuite de LDH et de GPT mais n'a pas diminué la fuite de GOT.

Tableau XXIV : INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LE CCL4 4mM / DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION EN TRAITEMENT SIMULTANE DURANT 30 MINUTES.

La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml (moyenne ± écart type, n=4). Comparaison des moyennes par le test t de Student par rapport au lot DMSO (^bp < 0,01, ^cp < 0,001), par rapport au lot CCL4 (^ep < 0,01).

PRODUIT	DOSE	LDH	GPT	GOT
DMSO	1 %	448 ± 26	36 ± 5	72 ± 7
CCl4	4 mM	781 ± 57 c	57 ± 9 b	159 ± 45 b
E 5141-3A	2,5	656 ± 36 e	49 ± 2	181 ± 28

4312. INFLUENCE DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA TOXICITE DU CCl4 EN TRAITEMENT SIMULTANE DURANT 60 MINUTES.

Le protocole suivi est décrit au paragraphe 3241 avec les conditions B.

Dans le tableau XXV sont regroupés les résultats obtenus lors de 5 essais indépendants (préparations issues de 5 rats différents). On observe une augmentation importante de la fuite des enzymes LDH, GPT et GOT dans les lots traités par le CCl4 10 mM, statistiquement significative comparée aux lots témoins non intoxiqués. L'extrait RT 1096 diminue de façon assez sensible la fuite des enzymes si l'on compare les lots traités avec la plante et le toxique par rapport aux lots traités avec le CCl4 seul. Si l'on examine les variations inter-groupes enregistrées avec les différentes enzymes, les écarts mesurés avec la GOT sont les plus nets. Cependant, parce qu'il existe des variations importantes intra-groupes, l'exploitation statistique fiable à partir de ces résultats ne met pas toujours en évidence cet effet. La tendance du RT 1096 à présenter un pouvoir hépatotrope vis à vis du CCl4 10 mM solubilisé dans l'éthanol n'a pas été reproduite dans l'essai 2.

Tableau XXV : INFLUENCE DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LE CCL4 10 mM/ ETHANOL DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION EN TRAITEMENT SIMULTANE DURANT 60 MINUTES.

La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml (moyenne ± écart type, n=4 sauf dans l'essai 5 ou n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student par rapport au lot témoin (^bp ≤ 0,01; ^cp ≤ 0,001) par rapport au lot intoxiqué (^dp < 0,05; ^ep < 0,01; ^fp < 0,001).

PRODUIT	DOSE	LDH	GPT	GOT
TEMOIN	.	ND	96 ± 6	ND
CCl4	10 mM	ND	450 ± 52 c	ND
RT + CCl4	1,25	ND	414 ± 17 c	ND
RT + CCl4	2,5	ND	328 ± 114c	ND
RT + CCl4	5	ND	382 ± 110c	ND
CCl4	10 mM	ND	310 ± 108	ND
RT + CCl4	1,25	ND	416 ± 26	ND
RT + CCl4	2,5	ND	348 ± 94	ND
RT + CCl4	5	ND	345 ± 110	ND
TEMOIN	.	ND	56 ± 3	ND
CCl4	10 mM	ND	318 ± 19 c	ND
RT + CCl4	2,5	ND	229 ± 57 c	ND
RT + CCl4	5	ND	289 ± 52 cd	ND
TEMOIN	.	707 ± 47	35 ± 2	56 ± 3
CCl4	10 mM	1432 ± 148 c	72 ± 9 b	543 ± 362
RT + CCl4	1,25	1569 ± 653	84 ± 39 b	616 ± 465
RT + CCl4	2,5	1079 ± 115 ae	61 ± 5 b	279 ± 73
RT + CCl4	5	ND	55 ± 2 bd	243 ± 27
TEMOIN	.	ND	61 ± 1	60 ± 3
ETHANOL	1 %	1349 ± 73	67 ± 4	82 ± 9
CCl4	10 mM	3274 ± 209 c	328 ± 16 c	1294 ± 121b
RT + CCl4	1,25	1100 ± 37 f	97 ± 4 e	174 ± 62 f
RT + CCl4	2,5	ND	207 ± 137	763 ± 634
RT + CCl4	5	ND	148 ± 67 d	402 ± 330d

ND = non déterminé

4313. INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA TOXICITE DU CCl4 EN TRAITEMENT PREVENTIF.

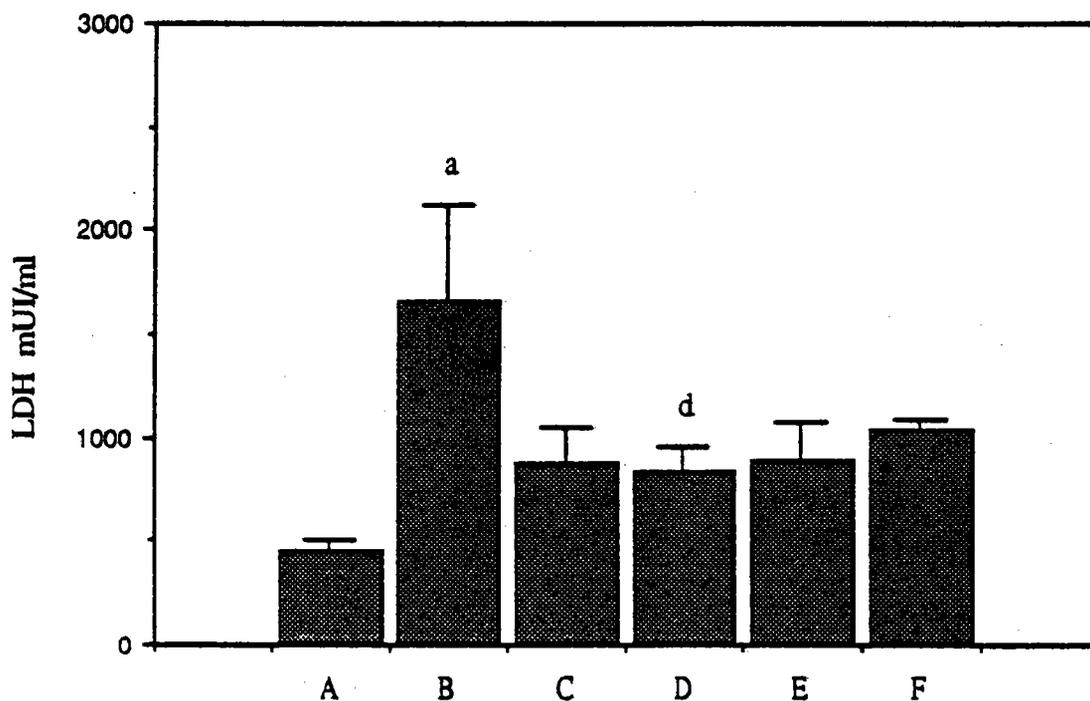
Le protocole suivi est décrit au paragraphe 3242 avec les conditions A.

Dans un premier essai, nous avons voulu voir si le temps de prétraitement des hépatocytes par l'extrait de plante supposé hépatotrope pouvait avoir une importance sur la réponse des cellules à l'agression du toxique de référence.

Les résultats présentés figures 43, 44 et 45 et tableau XXVI montrent que le CCl4 8 mM augmente nettement la fuite des enzymes LDH, GPT et GOT, malgré des écarts types importants dans le lot traité avec le toxique seul, la différence des moyennes est statistiquement significative comparée au lot témoin solvant. Une diminution importante (voisine de 50 %) de la fuite de ces enzymes est mesurée lorsque l'extrait E 5141-3A est ajouté aux cellules avant le toxique. Les valeurs mesurées aux divers temps de prétraitement sont sensiblement égales de telle sorte qu'un temps de prétraitement de 30 minutes est suffisant pour limiter l'impact du CCl4 8mM sur les hépatocytes. La faible augmentation de la fuite des enzymes entre les temps de prétraitement 30 minutes et 120 minutes atteste de la bonne viabilité des cellules.

Dans un deuxième essai nous avons reproduit le modèle ci dessus en limitant le temps de prétraitement des hépatocytes par l'extrait de plante à une durée de 30 minutes avant de les intoxiquer par le CCl4 pendant les 30 minutes suivantes. Dans le tableau XXVII sont regroupés les résultats obtenus lors de 3 préparations d'hépatocytes issus de foies de rat différents. Dans les 3 cas, l'extrait E 5141-3A testé aux doses de 1,25 et 2,5 mg de plante sèche/ml diminue nettement la fuite des enzymes LDH, GPT et GOT provoquée par le CCl4 8 mM solubilisé dans le DMSO et ajouté aux cellules sous un volume de 1%. La comparaison statistique des lots "protégés" par rapport aux lots intoxiqués est dans tous les cas statistiquement significative.

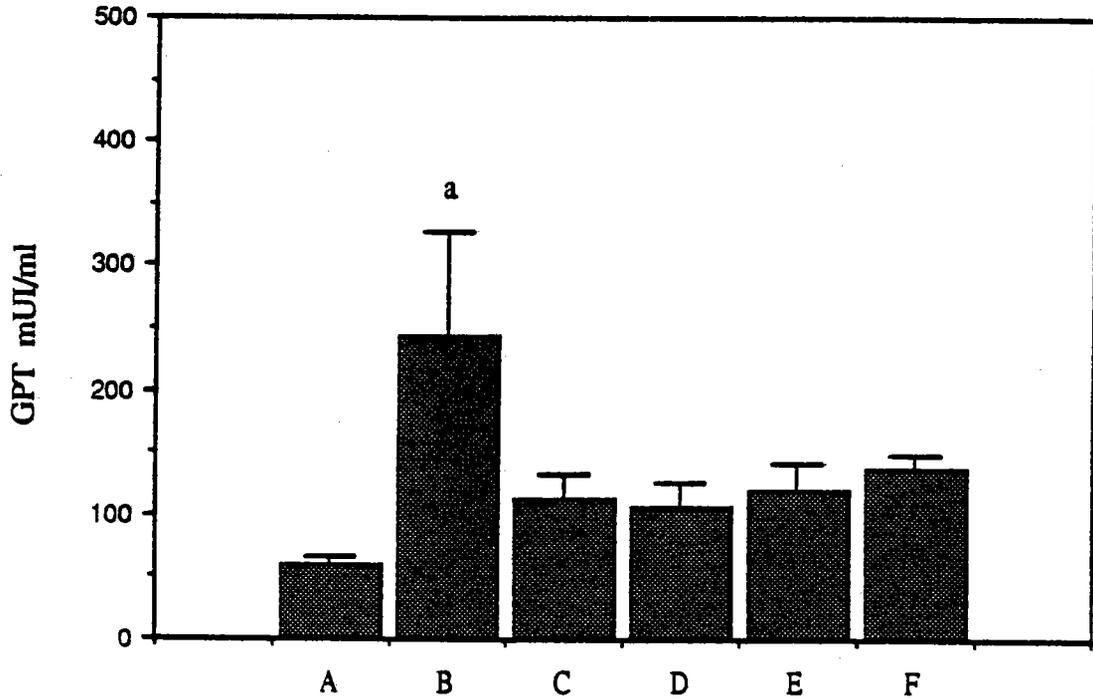
Dans les tableaux XXVI et XXVII les % de protection sont calculés selon la formule suivante :



- A = DMSO 1 %
- B = CCl4 8 mM
- C = E 5141-3A 2,5 mg de PS/ml 30 mn + CCl4 8mM 30 mn
- D = E 5141-3A 2,5 mg de PS/ml 60 mn + CCl4 8mM 30 mn
- E = E 5141-3A 2,5 mg de PS/ml 90 mn + CCl4 8mM 30 mn
- F = E 5141-3A 2,5 mg de PS/ml 120 mn + CCl4 8mM 30 mn

Figure 43 : INFLUENCE DU TEMPS DE PRETRAITEMENT PAR L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUITE DE L'ENZYME LDH INDUITE PAR LE CCL4 8 mM/DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION INTOXIQUES DURANT 30 MINUTES.

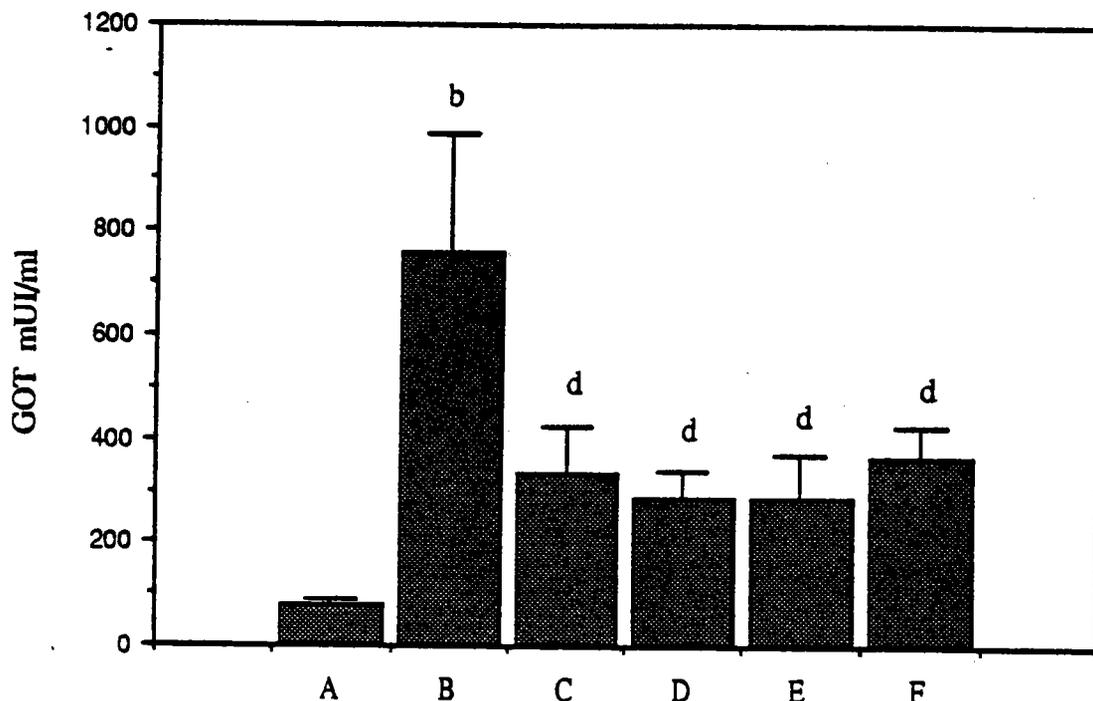
La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student par rapport au lot DMSO (^ap < 0,05) par rapport au lot intoxiqué (^dp < 0,05).



A = DMSO 1 %
B = CCl₄ 8 mM
C = E 5141-3A 2,5 mg de PS/ml 30 mn + CCl₄ 8mM 30 mn
D = E 5141-3A 2,5 mg de PS/ml 60 mn + CCl₄ 8mM 30 mn
E = E 5141-3A 2,5 mg de PS/ml 90 mn + CCl₄ 8mM 30 mn
F = E 5141-3A 2,5 mg de PS/ml 120 mn + CCl₄ 8mM 30 mn

Figure 44 : INFLUENCE DU TEMPS DE PRETRAITEMENT PAR L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUITE DE L'ENZYME GPT INDUITE PAR LE CCL₄ 8 mM/DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION INTOXIQUES DURANT 30 MINUTES.

La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student par rapport au lot DMSO (^ap < 0,05).



A = DMSO 1 %
B = CCl4 8 mM
C = E 5141-3A 2,5 mg de PS/ml 30 mn + CCl4 8mM 30 mn
D = E 5141-3A 2,5 mg de PS/ml 60 mn + CCl4 8mM 30 mn
E = E 5141-3A 2,5 mg de PS/ml 90 mn + CCl4 8mM 30 mn
F = E 5141-3A 2,5 mg de PS/ml 120 mn + CCl4 8mM 30 mn

Figure 45 : INFLUENCE DU TEMPS DE PRETRAITEMENT PAR L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUITE DE L'ENZYME GOT INDUITE PAR LE CCL4 8 mM/DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION INTOXIQUES DURANT 30 MINUTES.

La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student par rapport au lot témoin ($p < 0,01$) par rapport au lot intoxiqué ($p < 0,05$).

Tableau XXVI : INFLUENCE DU TEMPS DE PRETRAITEMENT PAR L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH GPT ET GOT INDUITE PAR LE CCL4 8 mM/DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION INTOXIQUES DURANT 30 MINUTES.

La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml (moyenne ± écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test t de Student par rapport au lot DMSO (^ap < 0,05; ^bp < 0,01) par rapport au lot intoxiqué (^cp < 0,05).

PRODUITS	DOSES	PRETRAITEMENT	LDH	GPT	GOT			
DMSO	1 %		455 ± 44	60 ± 6	81 ± 9			
CCL4	8 mM		1659 ± 467 ^a	243 ± 84 ^a	759 ± 227 ^b	0	0	0
E 5141-3A + CCL4	2,5 8 mM	30 MINUTES	877 ± 172	112 ± 20	335 ± 91 ^d	47	54	56
E 5141-3A + CCL4	2,5 8 mM	60 MINUTES	832 ± 119 ^d	106 ± 21	285 ± 53 ^d	50	56	62
E 5141-3A + CCL4	2,5 8 mM	90 MINUTES	890 ± 179	119 ± 22	286 ± 88 ^d	46	51	62
E 5141-3A + CCL4	2,5 8 mM	120 MINUTES	1030 ± 60	137 ± 11	368 ± 55 ^d	38	44	51

. LDH . GPT . GOT
 . % DE PROTECTION

Tableau XXVII : INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A EN PRETRAITEMENT DE 30 MINUTES SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LE CCL4 8 mM / DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION INTOXIQUEES DURANT 30 MINUTES.

La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml (moyenne ± écart type, n=5). Comparaison des moyennes par le test t de Student par rapport au lot intoxiqué (p < 0,05; p < 0,01 ; p < 0,001).

PRODUITS	DOSES	PRETRAITEMENT	LDH	GPT	GOT				
CCl4	8 mM		916 ± 221	142 ± 54	396 ± 116	0	0	0	
E 5141-3A + CCL4	2,5 8 mM	30 MINUTES	659 ± 147 d	87 ± 15 e	275 ± 91 d	28	39	31	
CCl4	8 mM		1835 ± 314	214 ± 4	915 ± 180	0	0	0	
E 5141-3A + CCL4	1,25 8 mM	30 MINUTES	819 ± 166 f	119 ± 24 f	372 ± 51 f	55	44	59	
CCl4	8 mM		1244 ± 110	139 ± 13	516 ± 80	0	0	0	
E 5141-3A + CCL4	1,25 8 mM	30 MINUTES	821 ± 58 f	95 ± 6 f	332 ± 43 e	34	32	36	
							LDH	GPT	GOT
							%	DE	PROTECTION

4314. INFLUENCE DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA TOXICITE DU
CCl4 EN TRAITEMENT PREVENTIF.

Le protocole suivi est décrit au paragraphe 3242 avec les conditions A.

Dans le tableau XXVIII sont regroupés les résultats obtenus lors de 5 préparations d'hépatocytes issus de foies de rat différents. Dans les 3 premiers essais, l'extrait RT 1096 testé aux doses de 1,25 et 2,5 mg de plante sèche/ml diminue faiblement la fuite des enzymes LDH ou GPT provoquée par le CCl4 8 mM après 30 minutes de traitement, la comparaison statistique des moyennes entre les lots "protégés" par l'extrait d'Eupatoire et les lots intoxiqués par le CCl4 est significative dans l'essai 2. Cependant, il faut noter que dans ces essais, le relargage de ces enzymes, lorsque les hépatocytes sont traités avec le toxique de référence, est faible bien que les différences des moyennes soient statistiquement significatives comparées aux lots témoins n'ayant reçu que le solvant DMSO 1%. En revanche, une diminution non négligeable des fuites enzymatiques est observée dans l'essai 4 dans lequel le CCl4 a provoqué un relargage très élevé. Un effet modérateur plus modeste est mesuré dans l'essai 5. Comparées aux lots traités par le CCl4, les moyennes des lots prétraités par l'extrait de plante sont statistiquement différentes.

Tableau XXVIII : INFLUENCE DE L'EXTRAIT RT 1096 EN PRETRAITEMENT DE 30 MINUTES SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LE CCL4 8 mM / DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION INTOXIQUES DURANT 30 MINUTES.

La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/10⁶ cellules par ml. (moyenne ± écart type, n=5). Comparaison des moyennes par le test de Bonferroni par rapport au lot témoin (^ap < 0,05; ^bp < 0,01; ^cp < 0,001) par rapport au lot intoxiqué (^dp < 0,05; ^ep < 0,01).

PRODUITS	DOSES	PRETRAITEMENT	LDH	GPT	GOT			
DMSO	1 †		ND	38 ± 2	ND			
CCL4	8 mM		ND	103 ± 24 a	ND		0	
RT 1096	1,25	30 MINUTES	ND	82 ± 51	ND		20	
+CCL4	8 mM							
RT 1096	2,5	30 MINUTES	ND	105 ± 42	ND		0	
+CCL4	8 mM							
DMSO	1 †		ND	56 ± 3	ND			
CCL4	8 mM		ND	114 ± 8 c	ND		0	
RT 1096	1,25	30 MINUTES	ND	91 ± 4 e	ND		20	
+CCL4	8 mM							
RT 1096	2,5	30 MINUTES	ND	83 ± 13 e	ND		27	
+CCL4	8 mM							
DMSO	1 †		601 ± 22	ND	ND			
CCL4	8 mM		807 ± 25 b	ND	ND		0	
RT 1096	1,25	30 MINUTES	754 ± 61	ND	ND		7	
+CCL4	8 mM							
RT 1096	2,5	30 MINUTES	792 ± 56	ND	ND		2	
+CCL4	8 mM							
DMSO	1 †		480 ± 133	60 ± 1	86 ± 2			
CCL4	8 mM		1460 ± 166 c	336 ± 45 c	1182 ± 200 c		0	0
RT 1096	2,5	30 MINUTES	895 ± 119 e	215 ± 26 d	699 ± 142 d		39	36
+CCL4	8 mM							41
RT 1096	5	30 MINUTES	986 ± 233 d	228 ± 53 d	878 ± 267		32	32
+CCL4	8 mM							26
DMSO	1 †		750 ± 35	45 ± 0	116 ± 3			
CCL4	8 mM		2063 ± 149 c	259 ± 22 c	721 ± 78 c		0	0
RT 1096	1,25	30 MINUTES	1661 ± 248	216 ± 27	566 ± 122		19	17
+CCL4	8 mM							21
RT 1096	2,5	30 MINUTES	1620 ± 199 d	217 ± 31	599 ± 113		21	17
+CCL4	8 mM							17

. LDH . GPT . GOT
 . † DE PROTECTION

432. HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE.

Les hépatocytes de rat sont isolés comme décrit au paragraphe 3221. La mesure de l'activité des enzymes libérées et totale est évaluée comme décrit au paragraphe 3322.

4321. INFLUENCE DE L'EXTRAIT RT 1096 SUR LA TOXICITE DU CCl4 EN TRAITEMENT PREVENTIF.

Le protocole suivi est décrit au paragraphe 3242 avec les conditions B.

Les résultats présentés tableau XXIX permettent de constater une augmentation importante de la fuite des enzymes LDH, GPT et GOT dans le lot traité par le CCl4 10 mM comparé au lot témoin solvant DMSO 1%, cette augmentation est significative statistiquement. Comparé au lot traité avec le toxique de référence, on observe une baisse discrète de la fuite de ces enzymes dans les lots qui ont été préincubés avec l'extrait RT 1096, non significative. Cette effet "anti-hépatotoxique" représente dans le meilleur des cas une protection de 15 % (GPT libérée dans le lot prétraité à la dose de 1,25 mg de plante sèche/ml). Comparée au lot témoin absolu, une petite diminution du relargage naturel des enzymes est observée dans le lot DMSO 1%.

Tableau XXIX : INFLUENCE DE L'EXTRAIT RT 1096 EN PRETRAITEMENT DE 29 HEURES SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LE CCL4 10 mM / DMSO DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE INTOXIQUES DURANT 60 MINUTES.

La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en mUI/ml (moyenne \pm écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test de Bonferroni par rapport au lot DMSO (^ap < 0,01; ^cp < 0,001).

PRODUIT	DOSE	LDH	GPT	GOT
TEMOIN	.	508 \pm 97	57 \pm 13	110 \pm 12
DMSO	1 %	369 \pm 49	44 \pm 6	93 \pm 17
CC14	10 mM	1072 \pm 128 b	132 \pm 18 c	434 \pm 41 c
RT + CC14	1,25	921 \pm 95 b	112 \pm 9 c	383 \pm 18 c
RT + CC14	2,5	1088 \pm 118 b	125 \pm 13 c	431 \pm 29 c
RT + CC14	5	1081 \pm 55 c	117 \pm 7 c	421 \pm 32 c
RT + CC14	10	1071 \pm 69 c	113 \pm 9 c	410 \pm 37 c

4322. INFLUENCE DES EXTRAITS E 5141-3A et RT 1096 SUR LA TOXICITE DE LA D-GALACTOSAMINE EN TRAITEMENT SIMULTANE.

Le protocole suivi est décrit au paragraphe 3242 avec les conditions C.

Les résultats présentés tableau XXX montrent :

- une augmentation de la fuite des enzymes LDH, GPT et GOT dans le lot traité avec la D-galactosamine 5 mM après 42 heures de culture; comparée au lot témoin non traité la différence des moyennes est statistiquement significative. Après les 18 heures de traitement, la faible augmentation mesurée n'est pas significative.
- au temps 18 heures, une nette augmentation de la fuite des enzymes dans le lot traité concomitamment par la D-galactosamine 5 mM et l'extrait E 5141-3A à la dose de 10 mg de plante sèche / ml; les moyennes comparées au lot témoin non traité ou au lot traité par le toxique de référence sont statistiquement différentes. Aux autres concentrations, on n'observe aucune différence entre les lots traités soit par l'extrait E 5141-3A ou par l'extrait RT 1096 et la D-galactosamine seule.
- au temps 42 heures, on observe une nette augmentation de la fuite des enzymes dans tous les lots traités comparés au lot témoin non traité, les moyennes sont toutes statistiquement différentes. Comparées au lot traité par la D-galactosamine, les valeurs mesurées dans les lots ayant reçu un "apport végétal" ne sont pas modifiées.

Un manque relatif de concordance entre les valeurs intrinsèques du relargage de la GOT et les valeurs de relargage de la LDH ou de la GPT est noté. Les réponses mesurées avec la GOT sont plus faibles et donc la mesure de cette enzyme est d'une moindre sensibilité dans ce cas de figure.

Tableau XXX : INFLUENCE DES EXTRAITS E 5141-3A ET RT 1096 SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LA D-GALACTOSAMINE 5 mM DANS LES HEPATOCYTES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE EN TRAITEMENT SIMULTANE.

Les concentrations d'extrait de plante sont exprimées en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en % (moyenne \pm écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe par rapport au lot témoin (^ap < 0,05; ^bp < 0,01; ^cp < 0,001).

PRODUIT	DOSE	LDH	GPT	GOT
TEMPS 18 HEURES				
TEMOIN		29,9 \pm 0,6	22,2 \pm 2,1	8,3 \pm 0,4
GAL-NH2	5 mM	34,8 \pm 4,2	27,8 \pm 2,2	10,0 \pm 0,9 a
E 5141-3A	1	32,7 \pm 0,9	26,4 \pm 1,4	8,4 \pm 0,1
+ GAL-NH2	5 mM			
E 5141-3A	2,5	32,3 \pm 0,7	26,4 \pm 1,1	8,2 \pm 0,2
+ GAL-NH2	5 mM			
E 5141-3A	5	33,5 \pm 0,5	29,2 \pm 0,7	8,0 \pm 0,1
+ GAL-NH2	5 mM			
E 5141-3A	10	57,7 \pm 1,3 c	43,8 \pm 0,4 b	10,4 \pm 0,3 a
+ GAL-NH2	5 mM			

RT 1096	1	31,8 \pm 2,3	27,8 \pm 0,0	7,8 \pm 0,8
+ GAL-NH2	5 mM			
RT 1096	2,5	31,3 \pm 1,8	26,4 \pm 0,4	7,8 \pm 0,4
+ GAL-NH2	5 mM			
RT 1096	5	31,6 \pm 1,5	27,8 \pm 1,1	8,3 \pm 0,4
+ GAL-NH2	5 mM			
RT 1096	10	33,6 \pm 1,3	28,5 \pm 0,0	7,9 \pm 0,5
+ GAL-NH2	5 mM			

Tableau XXX (suite)

PRODUIT	DOSE	LDH	GPT	GOT
TEMPS 42 HEURES				
TEMOIN		37,2 ± 0,6	25,7 ± 2,5	13,2 ± 0,4
GAL-NH2	5 mM	72,8 ± 5,8 c	54,2 ± 2,9 c	23,1 ± 1,7 c
E 5141-3A	1	72,1 ± 1,9 c	54,2 ± 2,4 c	22,2 ± 0,4 c
+ GAL-NH2	5 mM			
E 5141-3A	2,5	70,8 ± 2,1 c	52,8 ± 0,8 c	21,2 ± 1,3 c
+ GAL-NH2	5 mM			
E 5141-3A	5	68,2 ± 1,0 c	53,5 ± 1,4 c	20,0 ± 0,3 c
+ GAL-NH2	5 mM			
E 5141-3A	10	78,6 ± 0,9 c	55,6 ± 1,1 c	17,0 ± 0,6 c
+ GAL-NH2	5 mM			
RT 1096	1	70,6 ± 6,4 c	56,3 ± 2,5 c	21,5 ± 2,5 c
+ GAL-NH2	5 mM			
RT 1096	2,5	65,0 ± 6,0 c	50,0 ± 2,6 c	19,9 ± 1,3 c
+ GAL-NH2	5 mM			
RT 1096	5	67,7 ± 4,2 c	52,1 ± 2,5 c	19,9 ± 1,5 c
+ GAL-NH2	5 mM			
RT 1096	10	66,3 ± 2,0 c	50,0 ± 1,5 c	18,2 ± 1,2 c
+ GAL-NH2	5 mM			

433. HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE :
INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A SUR LA TOXICITE DE LA
D-GALACTOSAMINE EN TRAITEMENT SIMULTANE.

Les hépatocytes humains sont isolés comme décrit au paragraphe 3231. Le protocole suivi est décrit au paragraphe 3241 avec les conditions D. La mesure de l'activité des enzymes libérées et totale est évaluée comme décrit au paragraphe 3322.

Les résultats présentés figures 46, 47, 48 et tableau XXXI permettent de commenter d'une part, l'évolution de la fuite des enzymes LDH, GPT et GOT en fonction du traitement "infligé" aux hépatocytes pour chaque temps de prélèvement, et d'autre part, de commenter l'évolution des relargages enzymatiques pour chaque traitement en fonction du temps.

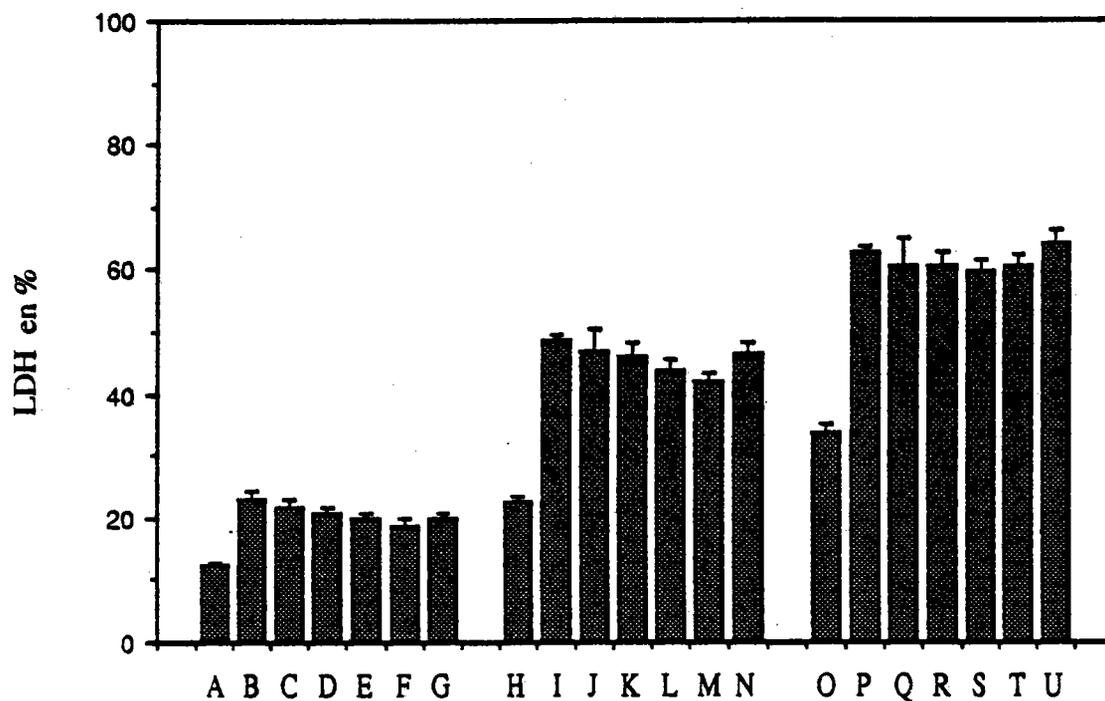
Au temps 22 heures :

Si l'on compare le lot traité avec la D-galactosamine 5 mM par rapport au lot témoin non traité, on observe une augmentation importante du relargage de la LDH et de la GPT statistiquement significative; en revanche la fuite de GOT n'est pas modifiée. Si l'on compare les lots traités concomitamment avec l'extrait d'Eupatoire et la D-galactosamine 5 mM, on observe une légère diminution de la fuite de LDH, GPT et GOT (un peu plus marquée dans le cas des fortes doses), cependant aucune de ces variations n'est statistiquement significative comparée au lot traité avec le toxique seul.

Au temps 48 heures et 72 heures :

Les commentaires sont identiques à ceux précédemment établis pour le temps 22 heures.

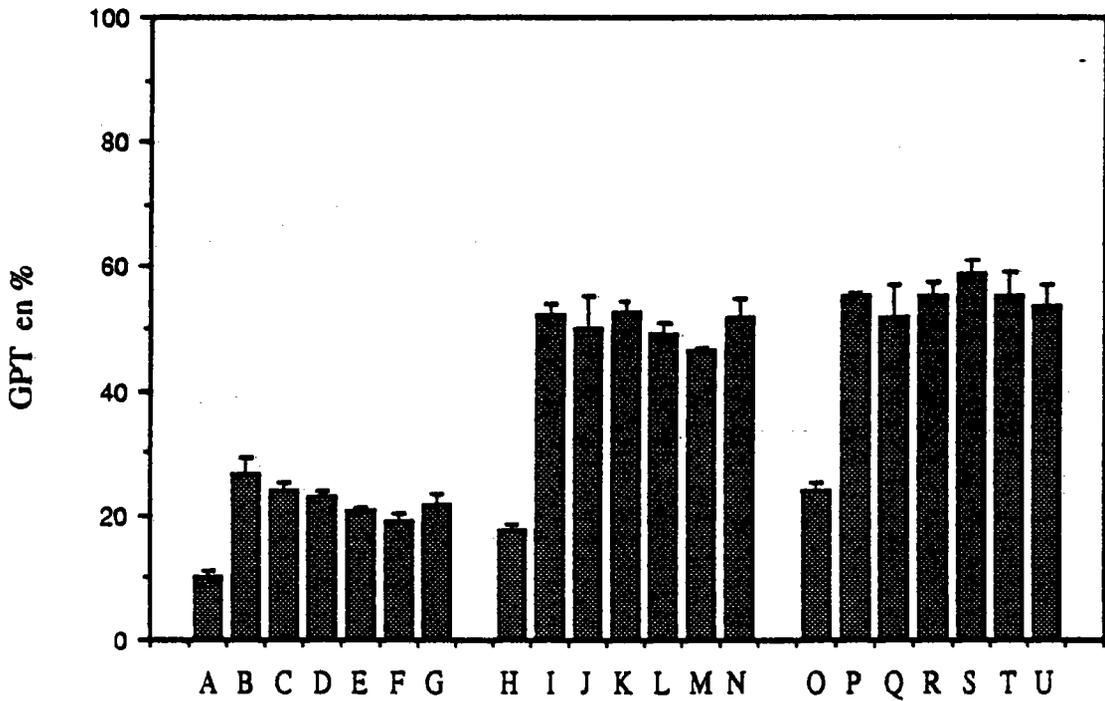
Maintenant, si l'on analyse l'évolution des relargages enzymatiques en fonction du temps, on observe une augmentation régulière de la fuite des enzymes précitées qui représente un phénomène naturel pour le lot témoin et qui peut être transposé globalement d'une façon similaire dans les autres cas où il y a eut intoxication par la D-galactosamine. On peut également remarquer la moindre sensibilité de la GOT par rapport à la GPT et surtout par rapport à la LDH.



TRAITEMENTS	. 22 HEURES	. 48 HEURES	. 72 HEURES
Témoin	. A	. H	. O
GAL-NH2 5 mM	. B	. I	. P
E 5141-3A 0,5 + GAL-NH2	. C	. J	. Q
E 5141-3A 1 + GAL-NH2	. D	. K	. R
E 5141-3A 2,5 + GAL-NH2	. E	. L	. S
E 5141-3A 5 + GAL-NH2	. F	. M	. T
E 5141-3A 10 + GAL-NH2	. G	. N	. U

Figure 46 : INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A EN TRAITEMENT SIMULTANE SUR LA FUITE DE L'ENZYME LDH INDUITE PAR LA D-GALACTOSAMINE 5 mM DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.

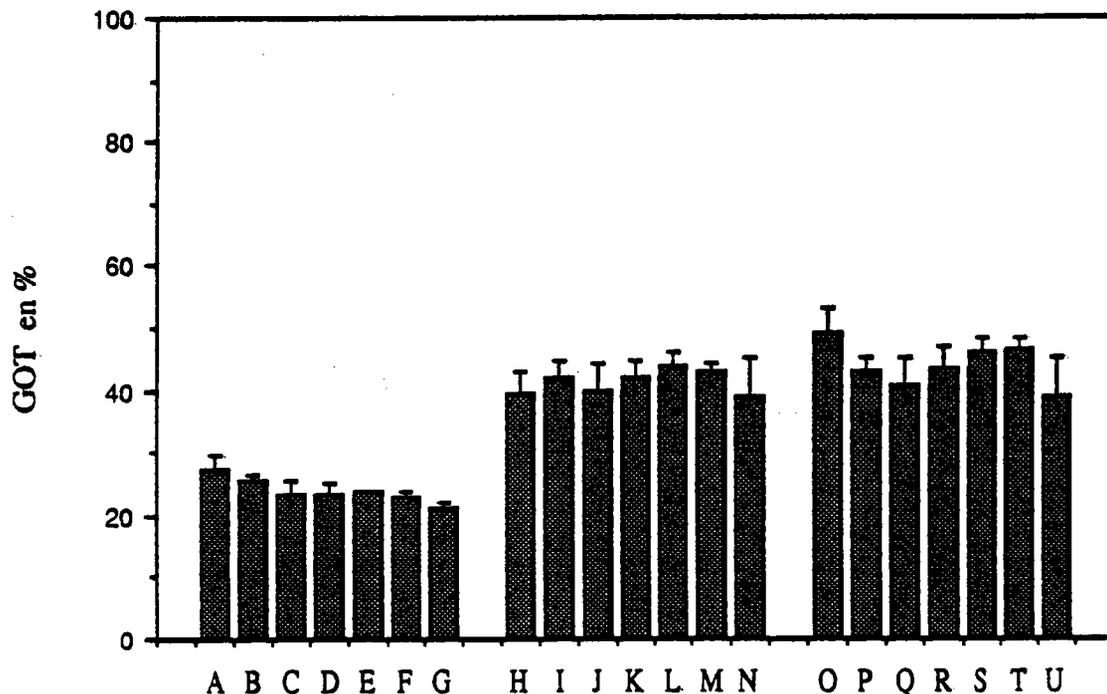
La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en % (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe ($p < 0,001$).



TRAITEMENTS	. 22 HEURES	. 48 HEURES	. 72 HEURES
Témoin	. A	. H	. O
GAL-NH2 5 mM	. B	. I	. P
E 5141-3A 0,5 + GAL-NH2	. C	. J	. Q
E 5141-3A 1 + GAL-NH2	. D	. K	. R
E 5141-3A 2,5 + GAL-NH2	. E	. L	. S
E 5141-3A 5 + GAL-NH2	. F	. M	. T
E 5141-3A 10 + GAL-NH2	. G	. N	. U

Figure 47 : INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A EN TRAITEMENT SIMULTANE SUR LA FUITE DE L'ENZYME GPT INDUITE PAR LA D-GALACTOSAMINE 5 mM DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.

La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en % (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe ($C_p < 0,001$).



TRAITEMENTS	22 HEURES	48 HEURES	72 HEURES
Témoin	A	H	O
GAL-NH2 5 mM	B	I	P
E 5141-3A 0,5 + GAL-NH2	C	J	Q
E 5141-3A 1 + GAL-NH2	D	K	R
E 5141-3A 2,5 + GAL-NH2	E	L	S
E 5141-3A 5 + GAL-NH2	F	M	T
E 5141-3A 10 + GAL-NH2	G	N	U

Figure 48 : INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A EN TRAITEMENT SIMULTANE SUR LA FUIITE DE L'ENZYME GOT INDUITE PAR LA D-GALACTOSAMINE 5 mM DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.

La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en % (moyenne + écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe ($p < 0,001$).

Tableau XXXI : INFLUENCE DE L'EXTRAIT E 5141-3A EN TRAITEMENT SIMULTANE SUR LA FUITE DES ENZYMES LDH, GPT ET GOT INDUITE PAR LA D-GALACTOSAMINE 5 mM DANS LES HEPATOCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE DURANT 72 HEURES.

La concentration de l'extrait de plante est exprimée en mg de plante sèche/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en % (moyenne \pm écart type, n=3). Comparaison des moyennes par le test de Scheffe par rapport au lot témoin ($p < 0,001$).

PRODUIT	DOSE	LDH %	GPT %	GOT %
TEMPS 22 HEURES				
TEMOIN	.	12,6 \pm 0,4	10,3 \pm 0,7	27,3 \pm 2,5
GAL-NH2	5 mM	23,0 \pm 1,3 c	26,5 \pm 2,5 c	25,6 \pm 1,0
E 5141-3A + GAL-NH2	0,5 5 mM	21,5 \pm 1,5 c	23,7 \pm 1,4 c	23,3 \pm 2,2
E 5141-3A + GAL-NH2	1 5 mM	21,0 \pm 0,5 c	23,0 \pm 0,7 c	23,6 \pm 1,7
E 5141-3A + GAL-NH2	2,5 5 mM	20,1 \pm 0,8 c	20,9 \pm 0,4 c	23,8 \pm 0,3
E 5141-3A + GAL-NH2	5 5 mM	18,6 \pm 1,3 c	19,1 \pm 1,1 c	22,9 \pm 1,0
E 5141-3A + GAL-NH2	10 5 mM	19,8 \pm 1,1 c	21,9 \pm 1,4 c	21,1 \pm 1,2
TEMPS 48 HEURES				
TEMOIN	.	22,6 \pm 0,7	17,7 \pm 1,1	39,5 \pm 3,5
GAL-NH2	5 mM	48,8 \pm 0,7 c	52,3 \pm 1,8 c	42,2 \pm 2,5
E 5141-3A + GAL-NH2	0,5 5 mM	46,8 \pm 3,8 c	49,8 \pm 5,3 c	40,0 \pm 4,2
E 5141-3A + GAL-NH2	1 5 mM	46,2 \pm 2,1 c	52,7 \pm 1,8 c	42,2 \pm 2,7
E 5141-3A + GAL-NH2	2,5 5 mM	44,0 \pm 1,7 c	49,1 \pm 1,8 c	43,7 \pm 2,2
E 5141-3A + GAL-NH2	5 5 mM	42,1 \pm 1,2 c	46,3 \pm 0,4 c	43,0 \pm 1,4
E 5141-3A + GAL-NH2	10 5 mM	46,4 \pm 1,9 c	51,6 \pm 3,2 c	39,0 \pm 6,2

Tableau XXXI (suite)

PRODUIT	DOSE	LDH %	GPT %	GOT %
TEMPS 72 HEURES				
TEMOIN		33,8 ± 1,1	24,0 ± 1,1	49,1 ± 3,9
GAL-NH2	5 mM	62,8 ± 0,7 c	55,1 ± 0,7 c	42,8 ± 2,5
E 5141-3A	0,5	60,4 ± 4,7 c	51,6 ± 5,7 c	40,6 ± 4,4
+ GAL-NH2	5 mM			
E 5141-3A	1	60,5 ± 2,4 c	55,5 ± 2,1 c	43,5 ± 3,5
+ GAL-NH2	5 mM			
E 5141-3A	2,5	59,6 ± 2,1 c	58,7 ± 3,2 c	45,9 ± 2,5
+ GAL-NH2	5 mM			
E 5141-3A	5	60,8 ± 1,6 c	55,1 ± 4,6 c	46,4 ± 1,9
+ GAL-NH2	5 mM			
E 5141-3A	10	64,1 ± 2,3 c	53,7 ± 3,5 c	39,1 ± 6,2
+ GAL-NH2	5 mM			

5. DISCUSSION.

Le but du travail qui nous fut confié était de mettre au point des modèles *in vitro* sur les hépatocytes en culture adaptés au criblage précoce de substances hépatotropes d'origine naturelle et pour lesquels nous avons volontairement développé une analyse la plus exhaustive possible des différentes conditions expérimentales.

Nos résultats ont montré :

a) Que le tétrachlorure de carbone qui est un produit toxique de référence bien connu, convient pour le développement de tests de criblage de substances hépatotropes dans des tests à court terme, sous réserve d'un emploi dans des conditions expérimentales judicieusement définies.

b) Que la D-galactosamine qui est un second produit toxique de référence bien connu, convient pour le développement de tests de criblage de substances hépatotropes dans des tests à long terme, sous réserve d'être elle aussi employée dans des conditions expérimentales judicieusement définies.

c) Que plusieurs modèles complémentaires d'hépatocytes en culture sont bien adaptés au criblage toxicologique précoce de substances nouvelles et que la multiplicité des méthodes biochimiques d'évaluation de la cytotoxicité représente autant d'informations utiles aux toxicologues pour définir les points d'impacts des dites substances sur les cibles cellulaires. L'observation systématique des hépatocytes en cours de traitement par les produits à tester constitue une série d'informations complémentaires indispensable.

d) Que plusieurs modèles *in vitro* sur les hépatocytes en culture permettent le criblage précoce des substances hépatotropes. Les modèles qui utilisent le tétrachlorure de carbone conviennent pour des tests à court terme. Les modèles qui utilisent la D-galactosamine conviennent pour des tests à long terme. En outre, les informations apportées lors de la recherche d'activités hépatotropes sur les modèles à court terme et sur les modèles à long terme ne sont pas redondantes mais elles sont complémentaires.

e) Qu'à partir de l'utilisation de différents modèles de culture appliqués à deux espèces Mammifères (le rat et l'homme) et un ensemble de marqueurs biochimiques et cytomorphologiques, les aspects principaux des phénomènes biologiques qui interviennent dans les processus d'intoxications cellulaires ont pu être abordés.

Nous pouvons toutefois discuter le choix des deux espèces ainsi que le choix des marqueurs qui ont été utilisés avant de reprendre point par point les résultats obtenus sur les modèles en conservant, dans cette discussion, la chronologie déterminée pour la présentation des résultats exposés dans la partie 4 de ce

mémoire soit :

- l'étude de la cytotoxicité des produits toxiques de référence
- l'étude de la cytotoxicité des extraits de plante
- l'étude des activités hépatotropes des extraits de plante

51. JUSTIFICATION DU CHOIX DES ESPECES ET DES MARQUEURS.

511. LES ESPECES.

Les expériences sur les hépatocytes en culture utilisent le plus souvent l'espèce "rat" pour fournir le support biologique des investigations toxicologiques *in vitro*. Il suffit d'interroger une base de données bibliographiques pour se rendre compte de l'abondance de la littérature qui fait appel à ce "collaborateur" polyvalent.

Le rat est l'espèce choisie pour la plupart des usages car il présente pour les toxicologues le véhicule commun qui offre les meilleurs compromis de rapport qualité/prix.

Le côté pratique est un des éléments majeurs qui plaide en faveur de l'utilisation de ce rongeur. En effet, il est facile de ce le procurer pour des coûts minimes. Les souches sélectionnées par les éleveurs sont stables et permettent de bonnes qualités dans la reproductibilité des résultats sans pour autant que ne puissent être gommées les variabilités individuelles qui se répercutent aussi bien dans les expériences *in vitro* que dans les expériences *in vivo*. La stabulation de ces animaux en animalerie est aisée et peu envahissante.

L'historique des résultats décrits depuis de nombreuses années à partir de ce "donneur" atteste du caractère généralement prédictif de cette espèce. Les résultats *in vitro* sont le plus souvent comparables aux résultats *in vivo*. Cependant, il ne faut pas éluder qu'il puisse exister parfois certaines contradictions ou certains manques de concordance dans les réponses enregistrées vis à vis de certaines molécules. Sur un grand nombre de composés testés *in vitro*, seuls deux d'entre eux donnent des résultats différents de ceux décrits *in vivo* (TYSON et al.1980, GUILLOUZO 1986).

Les opportunités de pouvoir utiliser des hépatocytes issus de foies humains nous ont permis d'aborder certaines expériences sur un modèle qui doit représenter à l'heure actuelle le support *in vitro* le plus prédictif. Animés par la dynamique du Professeur J-P CANO, certains chercheurs du Centre SANOFI Recherches de Montpellier travaillent en collaboration avec les organismes publics (INSERM U 128 et U 278) à l'optimisation de la technique d'obtention et de conservation des hépatocytes humains.

L'obtention de foies humains sains demeure d'un caractère exceptionnel. Aussi la mise au point par G FABRE et son équipe du service de Pharmacocinétique, de techniques de perfusion des

parties saines de biopsies hépatiques prélevées sur des patients cancéreux rend ce modèle plus fréquemment accessible. La validation des réponses mesurées dans des tests toxico-pharmacologiques sur des substances de référence est actuellement en cours au sein de cette équipe et laisse présager d'un avenir prometteur de ces techniques relativement moins délicates.

Dans les expériences dont nous discuterons les résultats dans la suite de cette partie 5, nous pouvons déjà annoncer qu'aucune contradiction n'a été observée entre les deux espèces "rat et homme". Seules quelques petites variations de cinétique ont montré un caractère parfois plus lent dans les réponses obtenues avec les hépatocytes humains par rapport aux hépatocytes de rat. Ceci plaide bien évidemment en faveur de l'utilisation de l'espèce rat. Ainsi, s'il est souhaitable de pouvoir confronter les résultats obtenus sur deux espèces Mammifères, le caractère prédictif des réponses obtenues avec l'espèce rat est tout à fait satisfaisant.

512. LES MARQUEURS DE LA CYTOTOXICITE.

Différents marqueurs biologiques et biochimiques ont permis de quantifier l'impact des substances testées sur les hépatocytes.

Il eut été possible de multiplier et de diversifier d'avantage les techniques de dosages dont la disponibilité nous était offerte au laboratoire (dosage de la malonaldéhyde pour l'étude de la lipoperoxydation, incorporation de sondes radio-marquées comme la ^{14}C leucine ou la ^3H thymidine pour l'étude des synthèses protéiques et des réparations de l'ADN, dosages du glutathion pour la mesure des phénomènes de détoxification, identification et dosage des différents cytochromes P-450 qui interviennent dans les biotransformations des molécules par les enzymes de phase I (Mixte Fonction Oxydase), dosage de la bêta-oxydation des acides gras pour la quantification des réserves lipidiques et bien d'autres encore). Cependant, le but de notre travail n'étant pas d'étudier les mécanismes biochimiques intervenant dans les processus d'intoxication des hépatocytes, nous avons sélectionné certains marqueurs spécifiques reconnus par les spécialistes pour présenter un caractère suffisant dans la quantification de la cytotoxicité des produits sur les cellules hépatiques.

Afin de pouvoir répondre à la définition d'un test de criblage qui doit être simple, rapide, fiable et peu coûteux, nous avons choisi des tests colorimétriques et enzymatiques qui puissent correspondre aux exigences précitées. Nous respecterons la chronologie décrite dans la partie 3 pour formuler quelques remarques sur la pratique de ces tests.

Le test de coloration au bleu Trypan est intéressant pour quantifier la viabilité des hépatocytes lors de leur mise en

suspension mais bien que simple et d'un poids pécuniaire insignifiant, il ne saurait correspondre à une utilisation répétée pour une méthode de criblage car même un technicien bien entraîné ne pourrait dénombrer assez vite les cellules dans de grandes séries de lots tout en respectant les temps de traitement.

Les dosages de l'activité des enzymes intracellulaires relarguées sont appropriés à une méthode de criblage. Les prélèvements sont rapides et les dosages peuvent soit se pratiquer dans la journée soit éventuellement se pratiquer a posteriori si les échantillons sont cryocongelés. Maintenus à une température de -20 degrés C nous avons vérifié que les échantillons peuvent rester stables plusieurs semaines pour être décongelés à température ambiante au moment du dosage. D'après plusieurs auteurs, la mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) apparaît être la plus représentative des enzymes libérées dans le milieu lors d'un dommage membranaire (GUILLOUZO 1986). L'activité importante de cette enzyme présente dans le cytosol des hépatocytes fait que la quantification de son activité relarguée dans le milieu est représentative des altérations même les plus minimes de la membrane plasmique des hépatocytes et fait qu'elle constitue un marqueur sensible de la cytotoxicité. Les auteurs considèrent que la quantification de ce marqueur correspond bien aux observations cytomorphologiques fournies par le test d'exclusion du bleu Trypan. Le dosage au moyen de kits à reconstituer achetés près à l'emploi dans le commerce rend sa mesure simple. La rapidité d'obtention des résultats dépendra des performances du spectrophotomètre dont on peut disposer. La mesure des deux autres enzymes que nous avons dosées (GPT et GOT) s'établit sur les mêmes principes de consommation du NADH. Nous avons mesuré l'activité de ces trois enzymes lorsque cela était possible mais en fonction de contingences logistiques ponctuelles, certains dosages n'ont considéré que l'une ou l'autre de ces trois enzymes. La mesure de ces trois enzymes ne nous semble pas superflue car elles apportent chacune des informations qui peuvent permettre des comparaisons avec les résultats d'autres auteurs ayant traité des sujets connexes mais ayant choisi soit de doser l'une ou l'autre de ces enzymes. A titre d'exemple, PERRISSOUD a surtout dosé la GOT et l'équipe de KISO et HIKINO a surtout dosé la GPT. A notre avis, ces choix ne sont pas forcément les plus judicieux car d'une part, l'activité de la GPT est beaucoup plus faible que celle de la LDH ce qui diminue la sensibilité du dosage et d'autre part, si l'activité de la GOT peut s'avérer importante d'un point de vue quantitatif et donc être d'une grande sensibilité, cette enzyme montre parfois des attitudes inattendues qui corrélerent mal avec les deux autres enzymes.

Très récemment, le dosage de la LDH intracellulaire a été proposé comme pouvant représenter un bon index de la cytotoxicité dans le modèle des hépatocytes de rat en culture primaire (CHAO et al.1988). Les manipulations sont assez nombreuses et nécessitent un temps de traitement des échantillons assez long ce qui ne nous semble pas souhaitable pour un test de criblage.

Le dosage des protéines totales est instructif et nous l'avons pratiqué en utilisant deux méthodes (Lowry adapté en microméthode pour les hépatocytes en culture primaire "classique" ou Bio-Rad pour les hépatocytes en microculture). L'intérêt est essentiellement de pouvoir disposer de chiffres représentatifs de la quantité de matière active ou non active qui reste attachée au fond des boîtes de cultures et ainsi de connaître la quantité de cellules encore présentes durant les différentes phases de l'expérience. Cette mesure peut avoir ces avantages et elle permet également de rapporter l'activité des enzymes libérées ou d'autres paramètres mesurés à l'unité de protéines (mg ou ug) afin de permettre des comparaisons inter-essais. Cependant, cette mesure a l'inconvénient de ne pas distinguer le vivant du subléthal ou du mort.

Les tests colorimétriques qui mesurent les capacités fonctionnelles des lysosomes à incorporer le rouge neutre ou qui mesurent les capacités fonctionnelles des mitochondries à biotransformer les sels de tétrazolium sont intéressants car ils complètent les mesures des activités enzymatiques puisqu'ils constituent des marqueurs de cibles cellulaires différentes. Ils ont été employés dans les tests sur hépatocytes de rat en microculture. Ils sont d'une réalisation très rapide, simple et peu coûteuse pour peu que l'on disposât d'un lecteur automatique de plaques de microtitration performant.

Dans les tests que nous avons pratiqués avec le modèle des hépatocytes de rat en microculture, la comparaison des résultats obtenus montre que les différents tests (LDH, rouge neutre, MTT et protéines) répondent dans des proportions voisines quand les hépatocytes sont soumis à l'agression des substances testées. Le test d'incorporation du rouge neutre est plus "sévère" que les autres tests ce qui se traduit par un calcul des doses efficaces 50 (doses qui provoquent 50 % de "dégats" dans les cultures) donnant une valeur de concentration de produit testé la plus faible.

Nous réservons une place particulière au dosage de la quantité d'albumine sécrétée. La mesure de ce paramètre a été choisie comme critère de bon fonctionnement des hépatocytes isolés et en culture dans le laboratoire d'A. GUILLOUZO à Rennes (GUILLOUZO 1986). Grâce à la compétence de B. BASUYAUX et à l'efficacité de son équipe dans la section Immuno-toxicologie du service commun de Toxicologie du Centre SANOFI Recherches de Montpellier, les dosages de l'albumine de rat et de l'albumine humaine par des méthodes radio-immunologiques en phase liquide ont été mis au point de novo et peuvent être employées aujourd'hui en routine. Ce dosage est d'une grande sensibilité et il est également spécifique, fiable et reproductible. Son élégance technique est à l'image de la délicatesse de sa réalisation. C'est un dosage long et coûteux qui demande la compétence de plusieurs personnes familiarisées avec les techniques de radio-marquages et d'immuno-dosages pour se pratiquer correctement ce qui en fait malheureusement un test convenant mal à un modèle de criblage. Son application pourra en

revanche satisfaire certaines demandes ponctuelles car la quantification de l'albumine sécrétée par les hépatocytes en culture constitue un très bon marqueur de l'intégrité fonctionnelle des dites cellules.

Les études cytomorphologiques sont complémentaires des mesures biochimiques. L'observation est généralement considérée comme une variable qualitative et non pas quantitative mais la constitution d'une échelle de cytotoxicité par une quotation d'abondance, telle que nous l'avons établie arbitrairement en tenant compte des critères habituels qui illustrent de la cytotoxicité d'un produit, permet de transformer une variable qualitative en une variable quantitative. Cette méthode qui procède par évaluations semi-quantitatives grossières est fréquemment utilisée en Ecologie, discipline pour laquelle les méthodes d'acquisition de données ont fait l'objet de très nombreuses recherches mathématiques. L'observation des cellules est souvent négligée par bien des chercheurs qui préfèrent "faire parler" les chiffres ce qui constitue une tâche délicate car elle demande aux chercheurs de posséder de solides bases en statistique; matière pour laquelle un emploi inadéquat peut très bien amener à des conclusions erronées. Aussi, les images fournies à l'oeil exercé du "cultivateur de cellules" par le microscope optique à contraste de phase seront autant de renseignements supplémentaires qui peuvent permettre une appréciation immédiate des phénomènes cytotoxiques majeurs. La microscopie électronique apporte pour sa part bien d'autres renseignements d'une grande finesse mais elle reste du domaine de la recherche anatomopathologique c'est à dire très délicate, longue, coûteuse et inadaptée à du criblage. L'observation quotidienne des cultures, si elle représente une approche *a priori* grossière permet de conforter les résultats biochimiques.

Une étude critique des résultats obtenus sur les différents modèles d'hépatocytes en culture sera développée. Elle abordera successivement les trois phases qui constituent l'ensemble de ce travail et qui ont été présentées au début de cette partie 5. Nous en rappelons les thèmes :

- l'étude de la cytotoxicité des produits toxiques de référence
- l'étude de la cytotoxicité des extraits de plante
- l'étude des activités hépatotropes des extraits de plante

52. CYTOTOXICITE DES PRODUITS DE REFERENCE.

Cette partie se réfère à la partie 41 qui concerne les résultats sur l'étude de deux substances toxiques de référence (le tétrachlorure de carbone et la D-galactosamine) qui ont été testées sur différents modèles d'hépatocytes de rat et d'hépatocytes humains en culture. Nous traiterons d'abord le cas du tétrachlorure de carbone puis celui de la D-galactosamine.

d'hépatocytes humains en culture. Nous traiterons d'abord le cas du tétrachlorure de carbone puis celui de la D-galactosamine.

521. LE TETRACHLORURE DE CARBONE.

Le tétrachlorure de carbone (CCL₄), de par ses propriétés physico-chimiques, est volatile et très faiblement soluble dans l'eau (0,08 % en poids à 20 degrés C) mais soluble par contre dans de nombreux solvants organiques (Fiche toxicologique I.N.R.S num. 8). Ceci rend donc son emploi délicat pour l'utiliser dans des milieux aqueux tels que ceux qui permettent de maintenir les hépatocytes en culture *in vitro*. Selon les auteurs, comme nous l'avons vu dans la partie 22, diverses options méthodologiques ont été décrites afin de permettre l'intoxication des cellules, avec plus ou moins de satisfaction suivant le but recherché. Lindstrom et al. (1978) utilisent 2,5 ul de CCl₄ pur dissout dans 10 ml de milieu alors que STACEY et PRIESTLY (1978), POLI et al. (1979) font diffuser au moins 15 ul de CCl₄ pur dans des flacons d'incubation à 2 compartiments afin de provoquer une fuite des enzymes intracellulaires LDH, GPT ou GOT après 20 à 60 minutes de traitement des hépatocytes de rat en suspension. Un inconvénient tient au fait qu'il soit nécessaire d'utiliser une verrerie spécialement conçue pour la réalisation de telles expériences. La quantification de la concentration de CCl₄ réellement présente dans le milieu d'incubation est délicate (KRACK et al. 1983). SANTONE et al. (1988) montrent qu'à partir d'une concentration initiale de 2 ou 4 mM de CCl₄ dissout dans le milieu, au préalable en conditions saturantes, il ne reste que 3,5 % de la quantité de départ au bout de 30 minutes quand le CCl₄ est utilisé dans les conditions de culture des hépatocytes à 37 degrés C.

L'utilisation d'un tiers solvant qui puisse servir de vecteur pour ajouter le CCl₄ aux cellules en culture représente une solution facile qui donne l'avantage de déterminer avec précision la quantité de toxique administrée au moins au début de l'expérience. FERRISSOUD et TESTA (1986) emploient le DMSO à raison de 3,6 % (v/v) et obtiennent une intoxication rapide (20 minutes) des hépatocytes de rat en suspension. L'éthanol est également utilisé, avec différents mouillages pour intoxiquer des hépatocytes de rat en suspension avec des doses de 10 à 40 mM de CCl₄ (BERGER et al. 1986) ou additionné pur sous un volume de 1 % dans le cas d'hépatocytes de rat en culture primaire (KISO et al. 1983a).

Voici donc posée une problématique cornélienne quant au choix judicieux à établir i.e. prendre un solvant ou non et dans l'affirmative, lequel est-il préférable d'élire ?

Au départ pour des raisons essentiellement d'ordre pratique, nous avons choisi d'ajouter le CCl₄ aux cellules au moyen d'un tiers solvant, tout d'abord en utilisant le DMSO puis l'éthanol.

Par différents types d'approches expérimentales sur le modèle des hépatocytes de rat en suspension, nous avons tenté de

définir des conditions d'étude de ce toxique de référence dans le but de visualiser un effet toxique le plus spécifique possible du CCl₄ en soit. Ce travail fait suite à un programme préliminaire de mises aux points techniques (ARVIS 1985).

Dans le modèle des hépatocytes de rat en suspension, l'impact du CCl₄ sur les cellules a été apprécié au moyen de la mesure de la viabilité résiduelle par le test classique de coloration au bleu Trypan et quantifié plus finement par la mesure du relargage d'enzymes intracellulaires telles que la LDH, la GPT ou la GOT qui sont des marqueurs bien connus pour leur aptitude à traduire les atteintes de la membrane plasmique des hépatocytes.

L'intégration de la technique mathématique des Plans Factoriels Complets pour construire un protocole expérimental sur les hépatocytes isolés constitue une approche méthodologique originale dans ce domaine de la toxico-pharmacologie. Cette méthode donne l'avantage au chercheur de disposer d'un plan d'expérience idéal qui associé à l'analyse par régression multiple pour le traitement statistique des résultats constitue sans doute la méthode la plus puissante actuellement disponible pour l'étude des interactions entre diverses substances bien que les interprétations soient assez délicates.

Dans les conditions expérimentales qui ont été définies au cours des essais sur la toxicité du CCl₄ dans les hépatocytes de rat en suspension, l'induction de dommages cellulaires importants avec de faibles concentrations de CCl₄ (2 mM) a été obtenue après un temps de traitement court (30 minutes) mais seulement dans le cas où des concentrations concomittantes de solvants élevées (3 à 5 %) étaient utilisées. Avec de telles conditions, il est difficile de déterminer quel poids il faut attribuer à l'action toxique du CCl₄ par rapport à l'action toxique du solvant ? L'utilisation de faibles concentrations de solvant (DMSO ou éthanol) implique d'avoir recours à des concentrations de CCl₄ plus élevées (8 à 10 mM) ce qui permet d'alléguer alors que l'action toxique mesurée sur les cellules est due principalement au CCl₄.

Les résultats obtenus dans ces conditions plus spécifiques montrent que le CCl₄ agit avec une grande célérité sur les hépatocytes de rat en suspension (5 minutes suffisent pour obtenir des relargages enzymatiques bien plus élevés que le témoin solvant). Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par PERRISSOUD (1981), KRACK et al. (1983), PERRISSOUD et TESTA (1986), BERGER et al. (1986). Cependant, l'intoxication des hépatocytes de rat en suspension que nous avons obtenue avec 8 mM de CCl₄ après 30 minutes de contact est moindre que celle décrite par AGUIAR (1985) qui laisse agir le toxique durant 120 minutes et additionne 0,5 % de sérum albumine bovine (SAB) au milieu de culture.

L'ajout de SAB aux milieux de culture est destiné à favoriser un maintien meilleur de la viabilité cellulaire ainsi qu'à empêcher les phénomènes de "clumping" mais cet additif providentiel interfère malheureusement sur la biodisponibilité du CCl₄ qui possède une grande affinité protéique. En se liant avec la SAB, la manifestation de la toxicité du CCl₄ est donc entravée (PERRISSOUD 1981). Pour cette raison, nous avons omis ce

cofacteur tout comme le recommandait PERRISSOUD mais nous avons compensé cette carence qualitative en utilisant un milieu riche (le Milieu essentiel Minimum de Eagle) plutôt employé dans les cultures primaires d'hépatocytes, préférentiellement à une solution saline équilibrée dopée en glucose (type Krebs Ringer Bicarbonate Glucose) tel que le pratique encore de nombreux auteurs.

D'après les observations précitées dans ce travail, avec l'éthanol, les résultats se sont concrétisés par des mesures plus dispersées qu'avec le DMSO. Ceci peut s'attribuer éventuellement au caractère volatile de l'éthanol. Pour ces raisons, il nous semble préférable de travailler avec du DMSO 1 % ou moins. De plus, ces remarques sont en accord avec les recommandations qu'il est habituel de rencontrer dans les rapports de toxicologie. La meilleure connaissance de la façon d'utiliser ce vecteur peut nous permettre d'expliquer pourquoi PERRISSOUD obtient, comme nous l'avons nous même vérifié, une intoxication rapide et un relargage de GOT significativement plus élevé que le témoin solvant en employant plus de 3 % de DMSO. De plus, la formation de bulles à la surface des hépatocytes traités avec du DMSO à forte dose durant 30 minutes, telle que les clichés de microscopie électronique à balayage l'ont révélé, corrobore cette hypothèse. PERRISSOUD ayant produit des clichés qui montrent l'intégrité de la membrane plasmique d'hépatocytes de rat en suspension traités par le DMSO 3,6 % durant 5 minutes n'a pu observer ce phénomène car le temps de prélèvement était trop court. L'analyse statistique des expériences mettant en oeuvre les Plans Factoriels Complets met clairement en évidence qu'il existe une synergie entre l'action toxique du CCl₄ et les fortes concentrations de solvant.

Ainsi, si l'on veut s'affranchir de l'action "parasite" du solvant, il est préférable de travailler avec des concentrations en solvant les plus faibles possibles afin de minimiser cet effet de synergie. Des concentrations de CCl₄ supérieures ou égales à 8 mM sont alors nécessaires. L'ajout du CCl₄ solubilisé dans 1 % de DMSO a pour ces raisons été adopté afin de tester l'éventuelle activité hépatotrope des extraits d'Eupatoire ce qui constituait le but initial de cette suite d'expériences sur le CCl₄.

Dans le modèle des hépatocytes de rat en culture primaire, l'intoxication des cellules par le CCl₄ 10 mM solubilisé dans le DMSO 1% a été quantifiée. Les valeurs de relargage enzymatique que nous avons obtenues sont tout à fait comparables à celles décrites par KISO et al. (1983a) qui en solubilisant le CCl₄ dans l'éthanol 1 % obtiennent des valeurs de relargage de GPT très groupées.

Comparée aux résultats obtenus avec les hépatocytes de rat en suspension, la variabilité intra-groupe est beaucoup plus faible avec les hépatocytes en culture primaire. Ceci constitue un avantage primordial du modèle culture primaire par rapport aux suspensions. Le modèle des hépatocytes en culture primaire présente aussi l'avantage de donner au chercheur la possibilité de réaliser des expériences "à grande échelle" et donc de récolter un nombre considérable d'informations à partir du même rat sans que l'expérimentateur ne soit sous l'emprise du stress

qu'engendre la chute de la viabilité de la suspension qui décroît en quelques heures.

522. LA D-GALACTOSAMINE.

Alors que l'étude de la toxicité du tétrachlorure de carbone peut s'envisager aussi bien sur le modèle des hépatocytes en suspension que sur le modèle des hépatocytes en culture primaire, l'analyse de la bibliographie sur la cytotoxicité de la D-galactosamine sur les hépatocytes *in vitro* souligne la nécessité de disposer d'un modèle d'hépatocytes en culture primaire pour aborder certains aspects de la cytotoxicité de cette molécule hydrosoluble. En effet, différents auteurs ont tenté mais sans succès, de provoquer un relargage d'enzymes intracellulaires comme la LDH, la GPT ou la GOT ou encore de diminuer la viabilité des hépatocytes en suspension en faisant agir ce toxique. PERRISSOUD (1981) a observé une diminution de la fuite de LDH et de GOT en traitant les hépatocytes de rat en suspension avec la D-galactosamine 10 mM durant 6 heures. OZTURK et al.(1984) ont étudié les effets de la D-galactosamine sur la morphologie et les altérations biochimiques des hépatocytes de rat en suspension traités durant 2 heures avec des concentrations de 2, 10 et 100 mM de toxique. Aucune de ces doses, même si élevées soient-elles, n'a modifié ni la viabilité cellulaire ni la fuite de LDH ou de GOT. Une très faible augmentation de la fuite de GOT a été observée dans des hépatocytes de rat en suspension traités avec 50 et 100 mM de D-galactosamine durant 60 minutes (MANGENEY et al.1985). Pour ces raisons, nous n'avons pas tenté d'intoxiquer des hépatocytes de rat en suspension avec la D-galactosamine mais nous avons utilisé le modèle des hépatocytes en culture primaire qui permet des expériences sur des temps bien supérieurs (plusieurs jours).

Lorsque les hépatocytes de rat en culture primaire ont été traités par différentes concentrations de D-galactosamine solubilisée et diluée dans le milieu MEM complet (0,25 à 10 mM) pendant 24 heures, nous n'avons pas observé d'augmentation importante de la libération d'enzymes intracellulaires telles que la LDH, la GPT ou la GOT. Lors d'un essai sur l'influence de l'ajout de sérum de veau dans du milieu de Williams, la D-galactosamine 0,5 mM a augmenté quelque peu la fuite de LDH alors qu'une fuite inférieure était mesurée avec une concentration double! Ce dernier résultat bien qu'en contradiction avec les observations précédentes peut trouver une explication : si l'on prend soin de regarder la mesure du relargage de LDH du lot témoin (27 %) on s'aperçoit que cette valeur est élevée et donc que nous avons des hépatocytes fragiles dont la sensibilité au toxique pouvait permettre une intoxication minime. Nos espoirs de pouvoir intoxiquer sévèrement les hépatocytes en les traitant par la D-galactosamine durant environ 24 heures ont été vains malgré des tentatives d'utiliser des concentrations fortes (10 mM). Les observations montrent même un effet dose inverse. Ces résultats ne s'accordent pas avec ceux

décrits par KISO et al. (1983c) dont le protocole destiné à valider un modèle de criblage des substances naturelles anti-hépatotoxiques vis à vis de la D-galactosamine s'inspirait des travaux de SCHANNE et al. (1980). Ces auteurs parviennent à induire un relargage de GPT bien supérieur au lot témoin en intoxicant des hépatocytes de rat en culture primaire durant 24 à 30 heures avec la D-galactosamine à la dose de 0,5 mM. Ce désaccord pourrait s'expliquer par une concentration du milieu plus élevée en $CaCl_2$ dans leurs modèles. Les travaux récents et très complets de TRAN-THI et al. (1985) sur la cytotoxicité de la D-galactosamine dans les hépatocytes de rat en culture primaire démontrent que la concentration de calcium extracellulaire n'intervient pas dans la toxicité de la D-galactosamine *in vitro*. Nous avons utilisé du milieu MEM complet pour les expériences de recherche d'un effet dose de la D-galactosamine durant 24 heures de traitement; ce milieu a été également employé par KISO et al. (1983b) ce qui contrecarre l'hypothèse que nous avons émise pour expliquer cette divergence entre les résultats de KISO et al. (1983b) et nos propres observations. En revanche, KISO et al. (1983b) précisent qu'ils intoxiquent les hépatocytes très tôt après les avoir ensemencés dans les boîtes de culture (1,5 heures) i.e. avant que ceux-ci n'aient totalement pu récupérer du stress de la perfusion, alors que nous avons traité les cellules plus tardivement (2 à 3 heures après ensemencement) donc avec des hépatocytes plus résistants.

En nous inspirant des travaux de TRAN-THI et al. (1985) nous avons été amenés à augmenter considérablement la durée des expériences sur la D-galactosamine tout en diminuant le temps de traitement à environ 20 heures. Les résultats que nous avons obtenus dans le modèle hépatocytes de rat en culture primaire lors des essais sur 72 et 96 heures ont confirmé ceux obtenus par ces auteurs. La D-galactosamine aux concentrations inférieures à 1 mM ne provoque pas de modification de la fuite de LDH et n'altère pas la viabilité des hépatocytes de rat même à long terme. Les concentrations supérieures à 2,5 mM (surtout 5 mM) augmentent nettement la fuite de cette enzyme à partir du deuxième jour de culture. L'inhibition du relargage de LDH proportionnel à la dose de D-galactosamine que nous avons généralement observé en fin de traitement (soit après 20 heures de contact environ) n'a à notre connaissance jamais été décrit.

Lorsque nous avons intoxiqué des hépatocytes humains en culture primaire avec différentes concentrations de D-galactosamine (0,5 à 5 mM) le protocole a été calqué sur celui qui donnait satisfaction avec les hépatocytes de rat. Les résultats obtenus amènent aux mêmes conclusions que dans le cas des hépatocytes de rat c'est à dire : toxicité retardée pour les concentrations de D-galactosamine supérieures à 2,5 mM (surtout 5 mM). L'inhibition de la synthèse d'albumine concomitante aux relargages enzymatiques prouve que la D-galactosamine altère non seulement la membrane plasmique mais encore une des fonctions du métabolisme des hépatocytes; aux doses supérieures à 2,5 mM cette inhibition est quasi totale.

D'un point de vue cinétique, les réponses enregistrées avec les hépatocytes humains sont un peu plus tardives qu'avec les

hépatocytes de rat. On pourrait être tenté de considérer que les hépatocytes de rongeur sont plus sensibles que les hépatocytes humains mais en fait les hépatocytes humains présentent un caractère "paresseux" (temps plus long que les hépatocytes de rat pour s'attacher au support et s'étaler pour former une monocouche) ce qui peut expliquer cette différence comportementale des deux espèces puisque le résultat final est identique.

Au terme de cette partie 52, nous rappelons que notre objectif initial était de définir des conditions expérimentales qui permettent de détecter les atteintes membranaires des hépatocytes subissant l'agression de deux toxiques de référence : le tétrachlorure de carbone et la D-galactosamine. Le CCl₄ convient aux tests à courts termes et la D-galactosamine aux tests à long terme. Ainsi nous pouvons disposer de deux (voire trois) modèles permettant le criblage de molécules ou substances d'origine naturelle susceptibles de présenter des propriétés hépatotropes.

53. CYTOTOXICITE DES EXTRAITS DE PLANTE.

Ce paragraphe se rapporte à la partie 42 dans laquelle nous avons décrit les différents résultats qui ont été observés pour la recherche d'éventuelles activités cytotoxiques des extraits d'Eupatoire (E 5141-3A et RT 1096) en utilisant plusieurs modèles *in vitro* d'hépatocytes en culture issus soit de foies de rat, soit de foies humains. Nous avons également appréhendé l'approche de la recherche d'une éventuelle activité cytotoxique d'un principe actif extrait du Chardon-Marie : la silymarine, en utilisant le modèle des hépatocytes de rat en culture primaire "classique".

La silymarine a été choisie parce qu'elle est réputée pour ses propriétés pharmacologiques hépatotropes, et sert souvent de référence tant *in vivo* qu'*in vitro*. Ce principe actif du *Silybum marianum* Gaertner (Compositae) entre dans la composition du LEGALON^R (A.M.M. 316 411.0). Nos résultats montrent que ce produit engendre *in vitro* une cytotoxicité importante, appréciée par la fuite de 2 enzymes reconnues comme des marqueurs des atteintes de la membrane plasmique des hépatocytes. A partir de la dose seuil de 40 ug/ml, on observe 41,4 % de relargage de LDH et 34,8 % de relargage de GPT. La réponse cytotoxique s'accroît lorsque la concentration du produit est augmentée : plus de 50 % de relargage de ces enzymes dans les hépatocytes traités avec 50 ug/ml et plus de 80 % de relargage de LDH dans les hépatocytes traités avec 100 ug/ml. Rares sont les publications qui nous permettent de comparer ces résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs. La silybine, testée sur des hépatocytes de rat en culture primaire dans des conditions expérimentales très voisines du modèle que nous avons employé, augmente de 324 % la fuite de GPT lorsque les hépatocytes sont

traités à la dose de 100 ug/ml, comparativement au lot témoin non traité (KISO et al.1983c). De même, différents principes actifs extraits du Chardon-Marie ont montré une cytotoxicité importante lorsqu'ils ont été testés sur les hépatocytes de rat en culture primaire aux doses similaires de 100 ug/ml (HIKINO et al.1984c). Dans cette dernière publication, les auteurs ont astucieusement vérifié l'influence des fortes concentrations des produits (1 mg/ml) sur le dosage de la GPT et ils ont constaté qu'il pouvait alors exister une interférence qui diminue la mesure de l'activité enzymatique de façon artificielle; nous avons ainsi attribué à un artéfact de dosage la diminution de relargage de LDH que nous avons mesurée entre les doses de 0,5 et 1 mg/ml. L'observation des cultures au microscope optique inverse à contraste de phase confirmait bien la nécrose et la mort des cellules ainsi traitées.

L'étude toxicologique que nous avons entreprise *in vitro* sur différents modèles d'hépatocytes en culture provenant soit de foies de rats soit de biopsies de foies humains pour évaluer l'innocuité ou l'éventuelle action cytotoxique de 2 extraits totaux aqueux d'*Eupatorium cannabinum* L. (Asteraceae) nous permet d'établir dans un tableau comparatif la synthèse des résultats regroupés tableau XXXII.

A concentrations de plante sèche équivalentes, une cytotoxicité plus importante a été mesurée dans le cas de l'extrait E 5141-3A que dans le cas de l'extrait RT 1096. Le calcul des concentrations efficaces 50 (CE 50), c'est à dire des doses qui provoquent 50 % de l'effet toxique, donne des valeurs comprises entre 5 et 7,5 mg de plante sèche/ml pour l'extrait E 5141-3A et des valeurs comprises entre 10 et 20mg de plante sèche/ml pour l'extrait RT 1096. Ces calculs sont réalisés à partir des données obtenues dans les tests sur hépatocytes de rat en culture primaire en microméthode.

Il est possible de considérer également qu'il existe une dose seuil non toxique de 2,5 mg de plante sèche/ml pour l'extrait E 5141-3A et 5 mg de plante sèche/ml pour l'extrait RT 1096. Cependant, il est remarquable de constater le peu d'écart qui sépare les doses non toxiques des concentrations efficaces 50.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de cette étude peuvent être comparés à ceux cités par LEXA (1988) qui concernent 2 autres extraits aqueux d'Eupatoire (E 85 et E 84-4). Testés sur le modèle des hépatocytes de rat en suspension à des concentrations comprises entre 1 et 5 mg de plante sèche/ml ces extraits n'ont pas révélé d'effet cytotoxique après 60 minutes de contact avec les cellules. Ces résultats ne sont donc pas en désaccord. Pourtant, compte tenu du faible écart de concentration qui sépare la dose limite non toxique de la dose efficace 50, que nous avons pu apprécier dans les tests sur hépatocytes de rat en culture primaire, il eut été souhaitable de tester des doses supérieures. Cette dernière remarque est aussi valable pour l'essai que nous avons effectué avec le RT 1096 sur les hépatocytes de rat en suspension, essai qui avait été conduit au départ pour s'assurer de l'innocuité du produit à des doses

susceptibles de présenter une activité hépatotrope.

La comparaison des résultats obtenus au moyen des différents modèles mis en oeuvre montre une très bonne concordance dans les réponses sur les hépatocytes de rat. Les hépatocytes humains en culture primaire montrent les mêmes effets que ceux observés sur les hépatocytes de rat mais ces cellules semblent un peu moins sensibles aux agressions des extraits d'Eupatoire que les hépatocytes de rongeur ou du moins elles manifestent une réponse plus tardive.

Des expériences que nous avons effectuées *in vivo* chez la souris, conformément aux normes en vigueur pour la recherche d'une toxicité aiguë sur 14 jours (DL 50), ont montré que les extraits aqueux bruts d'Eupatoire (E 5141-3A et RT 1096) n'ont pas entraîné de mortalité dans les lots d'animaux traités aux doses de 2,5; 5 et 10 g/kg en I.P.. Seuls quelques signes d'altérations du comportement des souris ont été notés aux fortes doses et ces perturbations ont régressé au cours des deux premiers jours qui ont suivi le traitement (résultats présentés annexe 6). La comparaison de la cytotoxicité de ces extraits d'Eupatoire testés sur un modèle *in vivo* et sur plusieurs modèles *in vitro* d'hépatocytes en culture montre que les modèles *in vitro* sont plus sensibles que le modèle *in vivo* chez la souris. Le contact direct des produits avec les cellules dans les tests *in vitro* en est sans doute la raison.

Tableau XXXII : SYNTHESE COMPARATIVE DE L'EFFET DE 2 EXTRAITS AQUEUX D'EUPATORIUM CANNABINUM L. SUR DIFFERENTS MODELES IN VITRO D'HEPATOCYTES EN CULTURE.

PRODUIT	DOSE	HEPATOCYTES DE RAT				HEPATOCYTES HUMAINS
		.mgPS/ml	EN SUSPENSION	EN CULTURE PRIMAIRE		
				CLASSIQUE	MICROMETHODE	
E 5141-3A	0,25	0	ND	ND	ND	
E 5141-3A	0,625	ND	0	0	ND	
E 5141-3A	1,25	ND	0	0	ND	
E 5141-3A	2,5	0	0	0	0	
E 5141-3A	5	ND	+	+	+	
E 5141-3A	7,5	ND	ND	+++	ND	
E 5141-3A	10	ND	+++	+++	+++	
E 5141-3A	20	ND	+++	+++	ND	
E 5141-3A	25	+++	ND	ND	ND	
E 5141-3A	40	ND	ND	+++	ND	
<hr/>						
RT 1096	0,625	ND	0	0	ND	
RT 1096	1,25	0	0	0	0	
RT 1096	2,5	0	0	0	ND	
RT 1096	5	0	0	0	0	
RT 1096	7,5	ND	ND	+	ND	
RT 1096	10	ND	++	+	0	
RT 1096	15	ND	ND	ND	0	
RT 1096	20	ND	++	+++	+	
RT 1096	40	ND	ND	+++	ND	

ND - NON DETERMINE ; 0 - NON TOXIQUE ; + - FAIBLE TOXICITE ; ++ - TOXICITE MARQUEE ; +++ - FORTE TOXICITE

54. RECHERCHE D'UN EFFET HEPATOTROPE DES EXTRAITS D'EUPATOIRE.

Cette partie se réfère aux résultats présentés dans la partie 43. Cette étude qui tente de vérifier l'activité hépatotrope de deux extraits aqueux bruts d'Eupatoire *in vitro* met en oeuvre plusieurs modèles d'hépatocytes de rat et d'hépatocytes humains en culture. Elle fait suite à une série de résultats positifs encourageants que nous avons obtenus avec l'extrait E 5141-3A (ARVIS 1985). L'activité hépatotrope alors démontrée à la dose de 2,5 mg de plante sèche/ml en utilisant des hépatocytes de rat en suspension intoxiqués par du CCl₄ 2 mM durant 30 minutes en traitement simultané n'avait pu nous donner entière satisfaction. En effet, le toxique solubilisé et dilué dans le DMSO était ajouté aux cellules sous un volume de 5 %, ce qui engendre, après 30 minutes de contact avec les hépatocytes, un effet cytotoxique synergique entre le toxique et son solvant comme nous l'avons vu dans la partie 41. Grâce aux indications éclairées de VAILLANT, le traitement statistique de ces résultats au moyen d'une régression multiple avec un changement de variable (pour éliminer artificiellement l'effet du DMSO) a été tenté mais ceci n'a pas permis de discriminer entre l'effet hépatotrope "anti-CCl₄" et l'effet hépatotrope "anti-DMSO". Il n'en demeure pas moins que l'extrait était actif à la dose de 2,5 mg de plante sèche/ml. Mais parce qu'il est important de pouvoir attribuer l'intoxication des hépatocytes par le CCl₄ à une action prépondérante du toxique sur les cellules dans le cas où l'on a recours à un tiers solvant, certaines réserves peuvent être émises quant à la validité de ces conditions expérimentales. De même pour le modèle de criblage des flavonoïdes mis au point par PERRISSOUD (1981) et repris par PERRISSOUD et TESTA (1986). En effet, ces auteurs utilisent 3,6 % de DMSO pour ajouter le CCl₄ 2 mM aux hépatocytes de rat en suspension traités durant 20 minutes. Si les effets "protecteurs" obtenus ne sont pas à remettre en cause, il nous semble hasardeux de les attribuer à un effet modérateur spécifique du CCl₄. En revanche, les résultats décrits par AGUIAR (1985) ne donnent pas matière à critique puisque le CCl₄ 2 mM solubilisé dans le DMSO est ajouté aux hépatocytes de rat en suspension sous un volume de 1 %.

Dans la partie 43 nous avons décrit les résultats qui concernent la recherche d'une éventuelle activité hépatotrope de 2 extraits aqueux d'Eupatoire E 5141-3A et RT 1096 vis à vis du CCl₄ dans les hépatocytes de rat en suspension ou en culture primaire et vis à vis de la D-galactosamine dans les hépatocytes de rat et les hépatocytes humains en culture primaire. Nous avons utilisé le dosage des enzymes intracellulaires relarguées telles que la LDH, la GPT et la GOT parce que leur quantification est reconnue pour servir de bons marqueurs de l'intégrité membranaire des hépatocytes.

Dans les essais sur hépatocytes de rat en suspension en traitement simultané durant des temps courts (30 minutes ou 60 minutes), il a été observé une discrète activité hépatotrope du E 5141-3A vis à vis du CCl₄ 4 mM/DMSO 1% et une tendance plus marquée du RT 1096 vis à vis du CCl₄ 10 mM/éthanol 1% pour des

concentrations de plante soit de 2,5 soit comprises entre 1,25 et 5 mg de plante sèche/ml respectivement pour chaque extrait testé.

Dans les essais sur hépatocytes de rat en suspension en traitement préventif, une activité hépatotrope importante a été observée avec le E 5141-3A (30 à 60 % de "protection" aux doses de 1,25 et 2,5 mg de plante sèche/ml) et une activité hépatotrope un peu plus faible a été mesurée avec le RT 1096 (20 à 40 % de "protection" aux doses de 1,25; 2,5 et 5 mg de plante sèche/ml). Les effets apparaissent les plus marqués lorsque l'intoxication par le CCl₄ est importante.

Dans l'essai sur hépatocytes de rat en culture primaire en traitement préventif long (29 heures) contre le CCl₄ 10 mM/DMSO 1%, une très faible diminution des relargages enzymatiques a été observée avec le RT 1096 à la seule dose de 1,25 mg de plante sèche/ml, ce qui ne pourrait en aucun cas s'interpréter comme une activité positive de l'extrait.

Dans l'essai sur hépatocytes de rat en culture primaire en traitement simultané contre la D-galactosamine 5 mM, aucune activité hépatotrope n'a été remarquée ni pour l'un ni pour l'autre des 2 extraits aqueux d'Eupatoire, testés pourtant sur un large spectre de concentrations.

Dans l'essai sur hépatocytes humains en culture primaire en traitement simultané contre la D-galactosamine 5 mM, l'extrait E 5141-3A a légèrement antagonisé la fuite de LDH et de GPT à la dose de 5 mg de plante sèche/ml durant les premières 48 heures de culture mais aucune activité hépatotrope flagrante n'a été mesurée.

Il est ainsi possible de dresser un bilan des activités hépatotropes des 2 extraits d'*Eupatorium cannabinum* L. qui nous ont été confiés pour les tester *in vitro* sur les hépatocytes en culture. Ce bilan est présenté tableau XXXIII et peut donner matière à quelques remarques.

Tout d'abord, il est manifeste que les expériences sur les hépatocytes de rat en culture primaire traités avec le CCl₄ 10 mM/DMSO 1% n'ont pas révélé d'activité hépatotrope du RT 1096. Elles n'ont, en fait, pas confirmé les résultats positifs obtenus dans les essais sur les hépatocytes de rat en suspension. Cette discordance apparente pourrait s'expliquer par la différence de temps de prétraitement (29 heures dans le cas des hépatocytes de rat en culture primaire et 30 à 120 minutes dans le cas des hépatocytes en suspension). On peut supposer que dans la "soupe" de molécules présentes dans cet extrait aqueux brut, les principes actifs hépatotropes pourraient soit avoir une action anti-CCl₄ rapide qui ne serait pas révélée lorsque le temps de prétraitement est trop long, soit être métabolisés par les hépatocytes et biotransformés en molécules non actives durant ce temps de préincubation de 29 heures. Afin de trouver une éventuelle réponse à cette hypothèse, il serait souhaitable de

réaliser prochainement quelques expériences complémentaires sur le même principe que celles qui ont été pratiquées sur les hépatocytes de rat en suspension c'est à dire : vérification de l'influence du temps de prétraitement des cellules par l'extrait de plante et optimisation des conditions de préincubation avant traitement par le toxique de référence.

Ensuite, l'absence de réponse hépatotrope positive dans les essais sur hépatocytes de rat et hépatocytes humains en culture primaire intoxiqués par la D-galactosamine, ne pose pas un réel problème d'interprétation dans la mesure où la toxicité de cette molécule hydrosoluble se manifeste essentiellement par une déplétion en nucléotides uridiniques et que son action sur la membrane plasmique de la cellule (révélée par la fuite d'enzymes intracellulaires telles que nous les avons mesurées) n'intervient qu'à un stade tardif comme nous l'avons vu dans les parties 22 et 41. Si l'on peut émettre l'hypothèse que l'extrait d'Eupatoire ait une action sur les altérations précoces de la membrane plasmique des hépatocytes, il est logique de ne pas obtenir d'effet sur les relargages enzymatiques provoqués tardivement par la D-galactosamine. Parce que les modes d'actions de ces 2 toxiques de références sont différents, leur utilisation en fait 2 modèles de criblage complémentaires. De plus, d'après les informations fournies par la littérature, il est fréquent de constater que bien des substances actives contre le CCl₄ ne le sont pas contre la D-galactosamine.

Enfin, la concordance entre les résultats obtenus dans les essais sur hépatocytes de rat et hépatocytes humains en culture primaire plaide en faveur du caractère prédictif des expériences pratiquées sur le rongeur à l'évidence plus aisées à réaliser que les expériences sur matériel humain. L'obtention toujours délicate de tissu hépatique d'origine humaine réserve ce modèle à des applications somme toute assez exceptionnelles.

Il est très difficile de comparer les résultats que nous avons décrits avec ceux qu'il est possible de trouver dans la littérature car les références concernant la recherche d'une activité hépatotrope d'extraits végétaux bruts sur des modèles d'hépatocytes en culture sont peu nombreuses. KISO et al. (1984a) ont montré qu'il peut exister des variations importantes de l'activité anti-hépatotoxique d'extraits méthanoliques d'épis d'*Artemisia capillaris* Tunberg (Compositae) en fonction de la provenance et de la date de récolte des plantes.

Nous avons vu dans la partie 23 que la plupart des références bibliographiques ayant trait à la détection d'une activité anti-hépatotoxique par des extraits végétaux utilisait des modèles sur hépatocytes de rat en culture primaire intoxiqués soit par le CCl₄ 10 mM/éthanol 1% soit par la D-galactosamine 0,5 mM. Pratiquement tous ces articles sont de provenance asiatique et peuvent être attribués à l'abondante littérature de l'équipe de KISO et HIKINO. Les auteurs qui utilisent des modèles sur hépatocytes *in vitro* s'intéressent généralement à la détection du pouvoir hépatotrope de principes actifs isolés et purifiés. Sans

vouloir passer en revue tous les produits (ô combien nombreux) qui ont pu être criblés par cette équipe nous ne pouvons nous soustraire à formuler sur ce point quelques remarques. Si les modèles développés pour le criblage précoce de substances hépatotropes, qu'elles soient d'origine naturelle ou de synthèse, sont tout à fait séduisants et nous ont beaucoup influencés dans notre démarche, il n'en demeure pas moins qu'il existe une carence importante quant à la recherche systématique d'une éventuelle cytotoxicité des substances testées. D'autre part, les concentrations de principes actifs efficaces sont généralement élevées (1 mg/ml) et il est fréquent de constater une forte toxicité des produits à cette dose dans les tests sur hépatocytes de rat en culture primaire après 24 heures de traitement, voire des artéfacts de dosage.

L'identification des composés chimiques présents dans des extraits d'Eupatoire fabriqués selon des modes de préparations galéniques similaires à celui utilisé pour l'obtention de l'extrait E 5141-3A a fait apparaître l'existence de certains composés susceptibles de posséder une activité antihépatotoxique tels que des diterpènes dérivés de clérodane, triterpènes (acétate de dammaradiényle), flavonoides (rutoside, hyperoside, quercétine, astragaline, acide p-coumarinique, acide férulique, isoquercétine et kaempférol-3-rhamnoside), acides phénols (acide caféique, acide chlorogénique et acide isochlorogénique), polysaccharides anti-inflammatoires et choline; mais surtout d'une lactone sesquiterpénique (l'eupatoriopicrine) présente en concentration importante (1%) dans les parties aériennes sèches (LEXA 1988). Ceci fait donc clairement apparaître que les résultats positifs obtenus avec les extraits aqueux bruts d'Eupatoire E 5141-3A et RT 1096 aux concentrations de 1,25 à 5 mg de plante sèche/ml sont sans commune mesure avec les concentrations des principes actifs purifiés qui sont généralement décrits comme présentant des activités antihépatotoxiques *in vitro*. Les valeurs maximales que pourraient représenter des concentrations théoriques de principes actifs contenus dans les extraits de plante E 5141-3A et RT 1096 seraient de 12,5 ug/ml à 50 ug/ml donc au moins 20 fois inférieures aux concentrations des principes actifs les plus souvent rencontrées dans la littérature.

La synthèse comparative des résultats qui concernent la recherche d'une activité hépatotrope des extraits aqueux bruts d'Eupatoire dans les différents modèles d'hépatocytes en culture est consignée tableau XXXIII.

Tableau XXXIII : INFLUENCE DES EXTRAITS AQUEUX BRUTS D'EUPATOIRE E 5141-3A ET RT 1096 SUR L'INTOXICATION PAR DES MOLECULES DE REFERENCE D'HEPATOCYTES ISOLES EN CULTURE SELON DIVERS MODELES.

ESPECE	MODELE	EXTRAIT	TOXIQUE	TRAITEMENT	EFFET HEPATOTROPE
RAT	I.H.C.	E-3A	CCL4	simultané	+
RAT	I.H.C.	RT	CCL4	simultané	+
RAT	I.H.C.	E-3A	CCL4	préventif	+++
RAT	I.H.C.	RT	CCL4	préventif	++
RAT	H.P.C.	RT	CCL4	préventif	négatif
RAT	H.P.C.	E-3A	GAL-NH2	simultané	négatif
RAT	H.P.C.	RT	GAL-NH2	simultané	négatif
HOMME	H.P.C.	E-3A	GAL-NH2	simultané	négatif
HOMME	H.P.C.	RT	GAL-NH2	simultané	négatif

I.H.C. = Hépatocytes isolés en suspension.
H.P.C. = Hépatocytes en culture primaire.

6. CONCLUSION.

La motivation à l'origine du présent travail est celle de bon nombre de toxicologues qui depuis ces dernières années accordent une part de plus en plus importante à l'utilisation de tests *in vitro*. Ces modèles complémentaires doivent permettre de modérer la consommation importante d'animaux de laboratoire que nécessitent les études toxicologiques "classiques".

En plein essor depuis ces dix dernières années, les modèles toxico-pharmacologiques *in vitro* sur culture de cellules hépatiques deviennent très performants et permettent de reproduire les phénomènes décrits chez l'animal *in vivo* de façon tout à fait satisfaisante.

Pour des raisons à la fois éthiques, scientifiques, économiques et politiques dont nous avons exposé les arguments, ces modèles cohabitent aujourd'hui avec les modèles "classiques" *in vivo* dans la plupart des laboratoires de Toxicologie et de Pharmacologie.

Les caractéristiques de ces modèles (simples, rapides, fiables, peu onéreux et prédictifs) les autorisent à être dès lors employés comme modèles complémentaires des modèles *in vivo*. Leur facilité d'utilisation alliée aux possibilités de pouvoir tester un nombre important de molécules, souvent disponibles en faibles quantités, les prédisposent à une utilisation précoce en tant que modèles de criblage dans les études toxico-pharmacologiques de substances nouvelles.

Au cours de ce travail, nous avons mis au point et utilisé plusieurs modèles de culture d'hépatocytes dans le but de donner aux toxico-pharmacologues des outils qui permettent de cribler des substances d'origine naturelle soit pour la recherche d'une éventuelle cytotoxicité soit pour la recherche d'une éventuelle activité hépatotrope.

Le cheminement qui s'applique au cas général de toute nouvelle molécule issue de la recherche pharmaceutique est le suivant :

NON.....	ARRET DE L'ETUDE ?
	.	.
RECHERCHE D'UN	..	.
EFFET PHARMACOLOGIQUE	.	.
OUI.....	TOXICITEOUI
	.	.
	.	.
	NON	.
	.	.
	.	.
	COMMERCIALISATION DU PRODUIT ?	

Dans cet exposé, nous avons présenté cette double approche avec une chronologie quelque peu différente de la chronologie "classique" en présentant la recherche de la toxicité du produit avant la recherche de l'activité pharmacologique. Cependant, les modèles *in vitro* permettent en fait de répondre à ces deux questions de manière quasi concomittante.

OUI.....	ARRET DE L'ETUDE ?

	...CYTOTOXIQUE.....	...
NON...
RECHERCHECOMMERCIALISATION ?
D'UN EFFET .	..OUI...	

	...PHARMACOLOGIQUE...	...
NON.....
		ARRET DE L'ETUDE ?

Cette démarche rigoureuse doit s'appliquer aux préparations d'origine naturelle qui renferment un certain nombre de principes actifs dont quelques uns sont bien connus mais dont la plupart gardent encore leurs mystères.

Puisqu'aujourd'hui on ne parle plus de médecines douces mais de phytothérapie et de phytomédicaments, la nécessité de contrôler les produits qui sont parfois trop souvent en vente libre inquiète les législateurs.

Ainsi, la démarche que nous avons adoptée répond au courant nouveau soutenu par les pouvoirs publics du Ministère de la Santé c'est à dire de sécuriser les utilisateurs de drogues naturelles par un "label" de qualité décerné à telle ou telle préparation commerciale. Certificat d'emploi sans risques (autorisation de mise sur le marché type AMM simplifiée) pour l'obtention duquel des tests scientifiques auront été effectués afin de garantir aux consommateurs au moins l'inocuité des préparations à défaut de garantir leur réelle efficacité.

C'est pour ces raisons et dans l'espoir que les résultats obtenus puissent éventuellement s'insérer dans un dossier d'expertise toxicologique et contribuer pour une part certainement fort modeste à la sécurité des usagers qu'au cours de cette étude, plusieurs modèles *in vitro* sur les hépatocytes de rat et les hépatocytes humains en culture ont été mis en oeuvre. Nous avons tenté d'optimiser certaines conditions expérimentales pour l'étude des effets cytotoxiques et hépatotropes de substances naturelles à partir d'un exemple reposant sur l'étude *in vitro* de deux extraits aqueux bruts d'*Eupatorium cannabinum* L. (Asteraceae). Ces modèles ainsi validés pourront ensuite servir en routine pour un criblage d'autres préparations naturelles.

La première partie de ce mémoire présente dans une brève introduction l'ensemble de ce qui suivra.

Dans une analyse bibliographique rapide nous avons décrit les principales données relatives aux modèles toxicopharmacologiques *in vitro*, puis aux hépatotoxiques de références que nous avons employés et enfin aux substances naturelles hépatotropes.

Dans un troisième chapitre nous avons décrit avec le plus de précision possible l'ensemble des techniques que nous avons utilisées dans cette étude.

Dans un quatrième chapitre nous avons présenté les résultats expérimentaux qui constituent la base de ce travail. Ce chapitre est lui-même subdivisé en trois parties qui décrivent successivement les résultats obtenus pour :

a) la mise au point de modèles hépatotoxiques sur des substances de référence (le tétrachlorure de carbone pour les tests à court terme et la D-galactosamine pour les tests à long terme).

b) la recherche d'une éventuelle cytotoxicité de deux extraits bruts d'Eupatoire dans des tests à court, moyen et long terme et celle d'une substance hépatotrope de référence (la silymarine) dans un test à moyen terme.

c) la recherche d'une éventuelle activité hépatotrope des extraits aqueux bruts d'Eupatoire vis à vis du tétrachlorure de carbone pour des tests à court terme et vis à vis de la D-galactosamine pour des tests à long terme.

Dans un cinquième chapitre sont consignés : l'ensemble des remarques critiques que nous avons pu formuler sur les résultats que nous avons obtenus, les comparaisons de ces résultats avec les données de la littérature qui pouvaient concerner des sujets connexes ainsi que des éléments synthétisant nos résultats. Nous avons présenté ces éléments de synthèse sous forme de tableaux afin d'en rendre la lecture plus directe qu'un long exposé comparatif et pour que l'accès aux informations soit plus aisé pour le lecteur.

Ce travail a permis de constater :

* Que deux produits de référence (le tétrachlorure de carbone et la D-galactosamine ont induit une franche cytotoxicité (nécrose des cellules). Le tétrachlorure de carbone est cytotoxique dans les modèles d'hépatocytes de rat en suspension et en culture primaire (pour les tests à court terme) et la D-galactosamine est cytotoxique dans les modèles d'hépatocytes de rat et d'hépatocytes humains en culture primaire (pour les tests à long terme).

* Que deux extraits aqueux bruts d'Eupatoire (E 5141-3A préparé conformément aux indications traditionnelles et RT 1096 préparé selon un procédé pilote semi-industriel) qui n'ont pas révélé de toxicité *in vivo* chez la souris pour des doses allant jusqu'à 10 g de plante sèche/kg injectés en I.P., ont montré une cytotoxicité marquée sur des modèles d'hépatocytes de rat en suspension, en culture primaire "classique et en microculture et aussi sur un modèle d'hépatocytes humains en culture primaire à des doses supérieures à 5 mg de plante sèche/ml dans le cas du lyophilisat E 5141-3A et à des doses supérieures à 10 mg de plante sèche/ml pour la poudre RT 1096. Les résultats obtenus sur les différents modèles à court terme et à long terme sont concordants et les résultats sur les deux espèces Mammifères (rat et homme) sont également concordants.

* Que les deux extraits d'Eupatoire diminuaient l'action toxique du tétrachlorure de carbone à des dose comprises entre 1,25 et 5 mg de plante sèche/ml lors de tests à court terme sur les hépatocytes de rat en suspension lors de traitements simultanés mais surtout lors de traitements préventifs courts (30 à 120 minutes). Ces résultats n'ont pas été reproduits sur le modèle des hépatocytes de rat en culture primaire lorsque les cellules étaient prétraitées par l'extrait RT 1096 durant 29 heures. La durée importante du temps de prétraitement qui est à mettre en relation avec l'étude de la cytotoxicité sur 24 heures pourrait expliquer cette discordance.

* Que le faible écart entre les concentrations cytotoxiques (5 et 10 mg de plante sèche/ml pour les extraits E 5141-3A et RT 1096 respectivement) et les concentrations actives contre la cytotoxicité du tétrachlorure de carbone (comprises entre 1,25 et 5 mg de plante sèche/ml) sont assez embarrassantes. Cette constatation sur la notion de coefficient thérapeutique est fâcheuse si l'on veut s'assurer d'une marge de sécurité confortable lors d'un traitement phytothérapique. La recherche systématique de la cytotoxicité est donc indispensable.

* Qu'aucun des deux extraits d'Eupatoire n'a diminué la cytotoxicité de la D-galactosamine lors de tests à long terme en traitement simultané que ce soit sur un modèle d'hépatocytes de rat en culture primaire ou que ce soit sur un modèle d'hépatocytes humains en culture primaire.

* Que les résultats obtenus sur les différents modèles d'hépatocytes en culture concordent entre eux et donc sont répétables et reproductibles non seulement intra-espèce mais encore inter-espèces.

* Que ces modèles *in vitro* sur hépatocytes en culture sont bien adaptés à la définition d'un modèle de criblage simple, rapide, fiable, peu onéreux et prédictif. Ainsi, leur utilisation conviendra à la recherche précoce soit d'une cytotoxicité soit d'une activité hépatotrope non seulement de substances d'origine naturelle mais encore de molécules purifiées ou de synthèse.

* Qu'un des intérêts supplémentaires, que nous avons jusqu'ici peu mis en exergue, est que les modèles que nous avons utilisés permettent de mener des études de cytotoxicité simultanément aux études des effets hépatotropes donc de voir les deux types d'effets sur une population de cellules homogène car les hépatocytes proviennent du même "donneur".

Le travail que nous présentons n'a pas la finalité de constituer **un plaidoyer pour les hépatocytes** car l'avenir des méthodes *in vitro* complémentaires des méthodes *in vivo* est aujourd'hui assuré.

7. BIBLIOGRAPHIE.

- AGUIAR K., 1985, Utilisation des hépatocytes fraîchement isolés pour l'étude de séries médicamenteuses, Thèse de Doctorat de troisième cycle, Université de Nancy, Faculté des Sciences, 136 p.
- ANDERS M.W., 1984, Biotransformation of halogenated hydrocarbons, in : Drug Metabolism and Drug Toxicity, 55-70, MICHELL J.R. and M.G. HORNING (eds.), Raven Press, New York, 436 p.
- ARVIS P.Y., 1985, Etude de l'effet hépatoprotecteur d'extraits végétaux sur hépatocytes isolés de rat, D.E.A. de Toxicologie, Université de Metz, 48 p.
- BACON B.R., A.S. TAVILL and R.O. RECKNAGEL, 1986, Lipid peroxidation and experimental iron overload, in : Hépatotoxicité médicamenteuse - Hepatotoxicity of drugs, 63-74, J.P. FILLASTRE (ed.), Edition INSERM, Rouen.
- BAUR H., S. KASPEREK and E. PFAFF, 1975, Criteria of viability of isolated liver cells, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 356, 827-838.
- BEGUE J.M., C. GUGUEN-GUILLOUZO, N. PASDELOUP and A. GUILLOUZO, 1984, Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type, Hepatology, 4, 839-842.
- BELLEMANN P., R. GEBHARDT and D. MECKE, 1977, An improved method for isolation of hepatocytes from liver slices, selective removal of trypan blue-dyeable cells, Analytical Biochemistry, 81, 408-415.
- BENFORD D.J. and S.A. HUBBARD, 1987, Preparation and culture of mammalian cells, 57-82, chap.3, in : Biochemical toxicology - a practical approach, SNELL K. and B. MULLOCK (eds), IRL Press, 286 p.
- BERGER M.L. and T. SOZERI, 1987, Rapid halogenated hydrocarbon toxicity in isolated hepatocytes is mediated by direct solvent effects, Toxicology, 45, 319-330.
- BERGER M.L., R.C. REYNOLDS and B. COMBES, 1987, Carbon tetrachloride-induced morphologic alterations in isolated rat hepatocytes, Exp. Mol. Pathol., 46, 245-257.
- BERGER M.L., H. BHATT, B. COMBES and R.W. ESTABROOK, 1986, CCl₄-induced toxicity in isolated hepatocytes : the importance of direct solvent injury, Hepatology, 6 (1), 36-45.

BERRY N.M., 1974, High-yield preparation of morphologically intact isolated parenchymal cells from rat liver, in : Methods in Enzymology, Biomembranes, FLEISHER S. and L. PACKER (eds.), 32, 625-632.

BERRY M.N., 1976, The development of techniques for the preparation of hepatic parenchymal cell suspensions - a history and rationale, in : Use of isolated liver cells and kidney tubules in metabolic studies, 131-138, TAGER J.M., H.D. SOLING and J.R. WILLIAMSON (eds.), North Holland Publishing Company, Amsterdam.

BERRY M.N. and D.S. FRIEND, 1969, High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells, a biochemical and fine structural study, J. Cell Biol., 43, 506-520.

BERRY N.M. and H.V. WERNER, 1974, Additional comments on the preparation of isolated liver cells, Alfred Benzon Symp. VI, 751-753.

BRIDGES J.W., D.J. BENFORD and S.A. HUBBARD, 1983, Mechanisms of toxic injury, Annals New York Academy of Sciences, 42-63.

CANO J.P., G. FABRE, P. MAUREL, N. BICHET, Y. BERGER and P. VIC, 1989, Interindividual variability and induction of cytochromes P-450 and UDP-glucuronosyl transferases in human liver microsomes and primary cultures of human hepatocytes, in : Cellular and Molecular aspects of glucuronidation, SIEST G., J. MAGDALOU and B. BURCHELL (eds.), in press.

CARLSEN S.A., E. SCHMELL, P.H. WEIGEL and S. ROSEMAN, 1981, The effect of the method of isolation on the surface properties of isolated rat hepatocytes, J. Biol. Chem., 256 (15), 8058-8062.

CASINI A.F. and J.L. FARBER, 1981, Dependence of carbon-tetrachloride-induced death of cultured hepatocytes on the extracellular calcium concentration, Am. J. Pathol., 105 (2), 138-148.

CETAMA, 1986, Statistique appliquée à l'exploitatin des mesures, MASSON, 2nde édition, 443 p. + 125 p. d'abaques.

CHAO E.S., D. DUNBAR and L.S. KAMINSKY, 1988, Intracellular lactate dehydrogenase concentration as an index of cytotoxicity in rat hepatocyte primary culture, Cell Biol. and Toxicol., 4 (1), 1-11.

CHENERY R., M. GEORGE and G. KRISHNA, 1981, The effect of ionophore A 23187 and calcium on carbon tetrachloride-induced toxicity in cultured rat hepatocytes, Toxicol. Appl. Pharmacol., 60, 241-252.

CHRISTIE G.S. and J.D. JUDAH, 1954, Mechanisms of action of carbon tetrachloride on liver cells, Proc. Roy. Soc. Ser. B., 142, 241-257.

CRESTO J.C., D.P. UDRISAR, R. IBARRA, M.C. CAMBEROS, J.C. BASABE and S.F. DeMAJO, 1981, Isolation of liver cells with Ca^{2+} and K^{+} chelating agents. Biochemistry and cell morphology, Acta Physiol. Latinoam., 31, 217-228.

C.E.A., 1978, Statistique appliquée à l'exploitation des mesures, MASSON, 1ère édition, tome 1, 296 p. et tome 2, 280 p.

DECKER K. and D. KEPPLER, 1972, Galactosamine-induced liver injury, in : Progress in liver diseases, POPPER H. and F. SCHAFFNER (eds.), 4, 183-199, Gune and Stratton, New York.

DECKER K. and D. KEPPLER, 1974, Galactosamine hepatitis. A key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 71, 77-106.

DIALLO B., M. VANHAELEN, Y. KISO and H. HIKINO, 1987, Antihepatotoxic actions of Cochlospermum tinctorium rhizomes, Journal of Ethnopharmacology, 20 (3), 239-243.

DICH J., C. VIND and N. GRUNNET, 1988, Long-term cultured of hepatocytes : effect of hormones on enzyme activities and metabolic capacity, Hepatology, 8 (1), 39-45.

EISENMANN A., J.E. PHILLIPS, A. SCHULZE-SPECKING and K. DECKER, 1984, The mechanism of lactate dehydrogenase EC.1.1.1.27 leakage from normal and D-galactosamine treated hepatocytes in monolayer culture, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 365 (4), 427-436.

EL-MOFTY S., M.C. SCRUTTON, A. SERRONI, C. NICOLINI and J.L. FARBER, 1975, Early reversible plasma membrane injury in galactosamine-induced liver cell death, Am. J. Pathol., 79, 579-595.

ESTERBAUER H., 1982, Aldehydic products of lipid peroxydation, 102-128, in : Free Radicals, Lipid Peroxydation and Cancer, McBRIEN D.C.H. and T.C. SLATER (eds.), Acad. Press, New York.

FABRE G., R. RAHMANI, M. PLACIDI, J. COMBALBERT, J. COVO, J.P. CANO, C. COULANGE, M. DUCROS and M. RAMPAL, 1988, Characterisation of midazolam metabolism using human hepatic microsomal fractions and hepatocytes in suspension obtained by perfusing whole human livers, Biochem. Pharmacol., 37 (22), 4389-4397.

FARBER J.L. and S. EL-MOFTY, 1975, The biochemical pathology of liver cell necrosis, Am. J. Pathol., 81, 237-250.

FLEURENTIN J., C. HOEFLER, A. LEXA, F. MORTIER and J.M. PELT, 1986, Hepatoprotective properties of *Crepis ruppellii* and *Anisotes trisulcus* : two traditional medicinal plants of Yemen, Journal of Ethnopharmacology, 16, 105-111.

FRONTIER S., 1981, Méthode statistique, applications à la biologie, la médecine et l'écologie, MASSON (ed.), 246 p.

FRY J.R., C.A. JONES, P. WIEBKIN, P. BELLEMANN and J.W. BRIDGES, 1976, The enzymic isolation of adult rat hepatocytes in a functional and viable state, Analytical Biochemistry, 71, 341-350.

GRAVELA E., E. ALBANO, M.U. DIANZANI, G. POLI and T.F. SLATER, 1979, Effects of carbon tetrachloride on isolated rat hepatocytes, inhibition of protein and lipoprotein secretion, Biochem. J., 178, 509-512.

GREEN S., 1988, Animal alternatives in toxicology, Journal of the American College of Toxicology, 7 (4), 459-462.

GREEN C.E., J.E. DABBS and C.A. TYSON, 1983, Functional integrity of isolated rat hepatocytes prepared by whole liver vs biopsy perfusion, Analytical Biochemistry, 129, 269-276.

GREIM H., 1980, Isolated cell systems as a tool in toxicological research, Arch. Toxicol., 44, 209-210.

GRISHAM J.W., R.K. CHARLTON and D.G. KAUFMAN, 1978, In vitro assay for cytotoxicity with cultured liver : accomplishments and possibilities, Environmental Health Perspectives, 25, 161-171.

GUARNER F., M. FREMONT-SMITH and J. PRIETO, 1985, Cytoprotective effect of prostaglandins on isolated rat liver cells, Liver, 5 (1), 35-39.

GUGUEN-GUILLOUZO C. and A. GUILLOUZO, 1983, Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes, Molec. Cell Biochem., 53-54, 35-56.

GUGUEN-GUILLOUZO C., J.P. CAMPION, P. BRISSOT, D. GLAISE, B. LAUNOIS, M. BOUREL and A. GUILLOUZO, 1982, High-yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver, Cell Biology International Reports, 6 (6), 625-628.

GUGUEN-GUILLOUZO C., B. CLEMENT, G. BAFFET, C. BEAUMONT, E. MOREL-CHANY, D. GLAISE and A. GUILLOUZO, 1983, Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type, Exp. Cell Res., 143, 47-54.

GUILLOUZO A., 1986, Utilisation des hépatocytes isolés et en culture pour des études de métabolisme et de cytotoxicité des xénobiotiques, in : Recherches en... Hépatocytes isolés et en culture, chap. 14, 327-346, GUILLOUZO A. et C. GUGUEN-GUILLOUZO (eds.), Les Editions INSERM/John Libbey Eurotext.

GUILLOUZO A. et C. GUGUEN-GUILLOUZO, 1986, Recherches en... Hépatocytes isolés et en culture, Les Editions INSERM/John Libbey Eurotext, 424 p.

GUSTAVSSON B. and J. MORLAND, 1980, Comparison of isolated rat hepatocytes prepared from liver slices and perfused liver with special reference to protein metabolism, *Analytical Biochemistry*, 108, 76-82.

HAHN G., H.D. LEHMANN, M. KURTEN, H. UEBEL and G. VOGEL, 1968, Zur pharmakologie und toxicologie von silymarin des antihepatotoxischen wirkprinzipes aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn., *Arzneim.-Forsh.*, 18, 698-704.

HANDA S.S., S. ANUPAM and K.K. CHAKRABORTI, 1986, Natural products and plants as liver protecting drugs, *Fitoterapia*, 57 (5), 307-351.

HEGARTY J.M., W.J. BRATTIN Jr. and R.O. RECKNAGEL, 1984, Halomethane-induced inhibition of protein synthesis in isolated hepatocytes, *Exp. Mol. Pathol.*, 41, 331-337.

HIKINO H., Y. KISO, S. AMAGAYA and Y. OGIHARA, 1984a, Antihepatotoxic actions of papyriogenins and papyriosides, triterpenoids of *Tetrapanax papyriferum* leaves, *Journal of Ethnopharmacology*, 12, 231-235.

HIKINO H., Y. KISO, H. TAGUCHI and Y. IKEYA, 1984b, Antihepatotoxic actions of lignoids from *Schizandra chinensis* fruits, *Plant Medica*, 50 (3), 213-218.

HIKINO H., Y. KISO, H. WAGNER and M. FIEBIG, 1984c, Antihepatotoxic actions of flavonolignans from *Silybum marianum* fruits, *Planta Medica*, 50 (3), 248-250.

HIKINO H., Y. KISO, T. HATANO, T. YOSHIDA and T. OKUDA, 1985a, Antihepatotoxic actions of tannins, *Journal of Ethnopharmacology*, 14, 19-29.

HIKINO H., T. SUGAI, C. KONNO, I. HASHIMOTO, S. TERASAKI and I. HIRONO, 1979, Liver-protective principle of *Thujopsis dolabrata* leaves, *Planta Medica*, 36, 156-163.

HIKINO H., M. TOHKIN, Y. KISO, T. NAMIKI, S. NISHIMURA and K. TAKEYAMA, 1986, Antihepatotoxic actions of *Allium sativum* bulbs, *Planta Medica*, 0 (3), 163-168.

HIKINO H., Y. KISO, N. KATO, Y. HAMADA, T. SHIOIRI, R. AIYAMA, H. ITOKAWA, F. KIUCHI and U. SANKAWA, 1985b, Antihepatotoxic actions of gingerols and diarylheptanoids, *Journal of Ethnopharmacology*, 14, 31-39.

HOEFLER C., J. FLEURENTIN, F. MORTIER, J.M. PELT and J. GUILLEMAIN, 1987, Comparative cholaretic and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 19, 133-143.

- HOFMANN F., S.R. WAGLE and K. DECKER, 1976a, Effect of D-galactosamine administration on nucleotide and protein metabolism in isolated rat Kupffer cells, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 1395-1400.
- HOFMANN F., J. WILKENING, J. NOWACK and K. DECKER, 1976b, Response of isolated rat hepatocytes to D-galactosamine and uridine, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 427-433.
- HOWARD R.B. and L.A. PESCH, 1968, Respiratory activity of intact, isolated parenchymal cells from rat liver, J. Biol. Chem., 243 (11), 3105-3109.
- HOWARD R.B., A.K. CHRISTENSEN, F.A. GIBBS and L.A. PESCH, 1967, The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver, J. Cell Biol., 35, 675-681.
- ISOM H.C., T. SCOTT, I. GEORGOFF, C. WOODWORTH and J. MUMMAW, 1985, Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture, Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 3252-3256.
- JEEJEEBOY K.N. and M.J. PHILLIPS, 1976, Isolated mammalian hepatocytes in culture, Gastroenterology, 71 (6), 1086-1096.
- JUDAH J.D., 1969, Biochemical disturbances in liver injury, Br. Med. Bull., 25, 274-277.
- KEPPLER D., J. PAUSCH and K. DECKER, 1974, Selective uridine triphosphate deficiency induced by D-galactosamine and reversed by pyrimidine nucleotide precursor : effect on ribonucleic acid synthesis, J. Biol. Chem., 249, 211-216.
- KEPPLER D., R. LESCH, W. REUTTER and K. DECKER, 1968, Experimental hepatitis induced by galactosamine, Exp. Mol. Pathol., 9, 279-280.
- KEPPLER D., J.F.M. RUDIGIER, E. BISCHOFF and K. DECKER, 1970, The trapping of uridine phosphates by D-galactosamine, D-glucosamine and 2-deoxy-D-galactose. A study on the mechanism of galactosamine hepatitis, Eur. J. Biochem., 17, 246-253.
- KIM R.S. and F.S. LABELLA, 1987, Criteria for determination of lipid peroxydation in tissues : estimation in liver of mice intoxicated with carbon tetrachloride, Can. J. Physiol. Pharmacol., 65 (7), 1503-1506.
- KISO Y., M. TOHKIN and H. HIKINO, 1983a, Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes, Planta Medica, 49, 222-225.
- KISO Y., M. TOHKIN and H. HIKINO, 1983b, Antihepatotoxic principles of Atractylodes rhizomes, J. Nat. Prod., 46 (5), 651-654.

KISO Y., M. TOHKIN and H. HIKINO, 1983c, Assay method for antihepatotoxic activity using galactosamine-induced cytotoxicity in primary-cultured hepatocytes, *Journal of Natural Products*, 46 (6), 841-847.

KISO Y., M. TOHKIN and H. HIKINO, 1985a, Mechanism of antihepatotoxic activity of Atractylon, I : effect on free radical generation and lipid peroxydation, *Planta Medica*, 0 (2), 97-100.

KISO Y., C. KONNO, H. HIKINO, Y. YAGI and I. HASHIMOTO, 1982, Liver-protective actions of desoxypodophyllotoxin and its analogs, *J. Pharm. Dyn.*, 5, 638-641.

KISO Y., Y. SUZUKI, N. WATANABE, Y. OSHIMA and H. HIKINO, 1983d, Antihepatotoxic principles of *Curcuma longa* rhizomes, *Plant Medica*, 49, 185-187.

KISO Y., M. TOHKIN, H. HIKINO, Y. IKEYA and H. TAGUCHI, 1985b, Mechanism of antihepatotoxic activity of Wuweizisu C and Gomisin A, *Planta Medica*, 0 (4), 331-334.

KISO Y., M. TOHKIN, H. HIKINO, M. HATTORI, T. SAKAMOTO and T. NAMBA, 1984a, Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin, I : effect on free radical generation and lipid peroxidation, *Planta Medica*, 51 (4), 298-302.

KISO Y., S. OGASAWARA, K. HIROTA, N. WATANABE, Y. OSHIMA, C. KONNO and H. HIKINO, 1984b, Antihepatotoxic principles of *Artemisia capillaris* buds, *Planta Medica*, 50 (1), 81-85.

KLAASEN C.D. and N.H. STACEY, 1982, Use of isolated hepatocytes in toxicity assessment, in : *Toxicology of the liver*, 147-180, PLAA G.L. and W.R. HEWITT (eds), Raven Press, New York, 338 p.

KRACK G., D. DEBOYSER, F. GOETHALS, P. VOSSEN and M. ROBERFROID, 1983, An in vitro model for acute toxicity testing using hepatocytes freshly isolated from adult mammals, Homburger F. (ed.), *Safety evaluation and regulation of chemicals 2*, 2nd International Conference, Cambridge, Mass., USA, Karger S., Basel, 1985, 0 (0), 286-294.

KREBS H.A., N.W. CORNELL, P. LUND and R. HEMS, 1974, Isolated liver cells as experimental material, in : *Regulation of hepatic metabolism*, 726-750, LUNDQUIST F. and W. TYGSTRUP (eds.), New York, Acad. Press.

LAMB R.G., S.B. McCUE, D.R. TAYLOR and M.A. McGUFFIN, 1984, The role of phospholipid metabolism in bromobenzene - and carbon tetrachloride - dependant hepatocyte injury, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 75, 510-520.

LANS M., J. DEGERLACHE, M. MERCIER et M. ROBERFROID, 1980, Modèle expérimental d'hépatite toxique, *J. Pharm. Belg.*, 35 (6), 401-407.

- LEHNINGER A.L., 1981, BIOCHIMIE - Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires, 2nde Edition, Flammarion et Cie (eds.), 1088 p.
- LELLOUCHE J. et P. LAZAR, 19.., Méthodes statistiques en expérimentation biologique, FLAMMARION MEDECINE SCIENCES, Paris, 283 p.
- LEXA-ROBIN A., 1988, Propriétés cholérétiques, antihépatotoxiques et diurétiques d'Eupatorium cannabinum L.: approche ethnopharmacologique, Thèse de Doctorat de l'Université de Metz, 257 p.
- LEXA A., J. FLEURENTIN, P.R. LEHR, F. MORTIER, M. PRUVOST and J.M. PELT, 1988, Choleric and hepatoprotective properties of Eupatorium cannabinum in the rat, submitted to publication.
- LINDSTROM T.D., M.W. ANDERS and H. REMMER, 1978, Effect of phenobarbital and diethyl maleate on carbon tetrachloride toxicity in isolated rat hepatocytes, Exp. Mol. Pathol., 28, 48-57.
- LONG R.M. and L. MOORE, 1988, Biochemical evaluation of rat hepatocyte primary cultures as a model for carbon tetrachloride hepatotoxicity : comparative studies in vivo and in vitro, Toxicol. Appl. Pharmacol., 92 (2), 295-306.
- LOWRY O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL, 1951, Protein mesurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Mac QUEEN C.A. and G.M. WILLIAMS, 1982, Cytotoxicity of xenobiotics in adult rat hepatocytes in primary culture, Fund. Appl. Toxicol., 2, 139-144.
- MANDL J., T. GARZO and F. ANTONI, 1983, Ethanol potentiates the inhibitory effect of D-galactosamine on protein synthesis in isolated hepatocytes, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112, 361-365.
- MANGENEY M., O. SIRE, J. MONTAGNE and J. NORDMANN, 1985, Effect of D-galactosamine in vitro on (U-14C) palmitate oxidation, triacylglycerol synthesis and secretion in isolated hepatocytes, Biochem. Biophys. Acta, 833, 119-127.
- MANGENEY-ANDREANI M., O. SIRE, J. MONTAGNE-CLAVEL, R. NORDMANN and J. NORDMANN, 1982, Inhibitory effect of D-galactosamine administration on fatty acid oxidation in rat hepatocytes, FEBS Lett., 145, 267-270.
- MEDLINE A., F. SCHAFFNER and H. POPPER, 1970, Ultrastructural features in galactosamine-induced hepatitis, Exp. Mol. Pathol., 12, 201-211.

MICHALOPOULOS G. and H.C. PITOT, 1975, Primary culture of parenchymal cells on collagen membranes : morphological and biochemical observations, *Exp. Cell Res.*, 94, 70-78.

MOORE L., 1980, Inhibition of liver-microsome calcium pump by in vivo administration of CCl₄, CHCl₃ and 1,1-dichloroethylene (vinylidene chloride), *Biochem. Pharmacol.*, 29 (18), 2505-2511.

MYAZAKI M., Y. HANDA, M. ODA, T. YABE, K. MIYANO and J. SATO, 1985, Long survival of functional hepatocytes from adult rat in the presence of phenobarbital in primary cultures, *Exp. Cell Res.*, 159, 176-190.

NAKAGAWA S., S. YOSHIDA, Y. HIRAO, S. KASUGA and T. FUWA, 1985, Cytoprotective activity of components of Garlic, Ginseng and Ciuwjia on hepatocyte injury induced by carbon tetrachloride in vitro, *Hiroshima J. of Medicinal Sciences*, 34 (3), 303-309.

NOGUCHI T, K.L. FONG, E.R. LAI, S.S. ALEXANDER, M.M. KING, L. OLSON, J.L. POYER and P.B. McCAY, 1982, Specificity of a phenobarbital-induced cytochrome P-450 for metabolism of carbon tetrachloride to the trichloromethyl radical, *Biochem. Pharmacol.*, 31, 615-624.

OZTURK M., F. LEMONNIER, D. CRESTEIL, J. SCOTTO and A. LEMONNIER, 1984, Methionine metabolism and ultrastructural changes with D-galactosamine in isolated rat hepatocytes, *Chem. Biol. Interact.*, 51 (1984), 63-76.

PACKER J.E., T.F. SLATER and R.L. WILLSON, 1978, Reactions of the carbon tetrachloride-related peroxy free radical (CCl₃O₂.) with amino acids : pulse radiolysis evidence, *Life Sciences*, 23, 2617-2620.

PENCIL S.D., E.A. GLENDE Jr. and R.O. RECKNAGEL, 1982, Loss of calcium sequestration capacity in endoplasmic reticulum of isolated hepatocytes treated with carbon tetrachloride, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 36 (3), 413-428.

PENCIL S.D., W.J. BRATTIN, E.A. GLENDE Jr. and R.O. RECKNAGEL, 1984, Evidence against a role for disturbed hepatocellular calcium homeostasis in the fatty liver of carbon tetrachloride hepatotoxicity, *Toxicologic Pathology*, 12 (1), 96-100.

PENCIL D.S., W.J. BRATTIN Jr., E.A. GLENDE Jr. and R.O. RECKNAGEL, 1984, Evidence against involvement of calcium in carbon tetrachloride-dependant inhibition of lipid secretion by isolated hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.*, 33 (15), 2425-2429.

PERRISSOUD D., 1981, Mise au point d'une méthode biologique pour la sélection de molécules hépatotropes du groupe des flavonoïdes, Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Lausanne, 234 p.

PERRISSOUD D. and B. TESTA, 1986, Inhibition or potentiating effects of flavonoids on carbon tetrachloride-induced toxicity in isolated rat hepatocytes, *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, 36 (8), 1249-1253.

PERRISSOUD D., M.F. MAIGNAN and G. AUDERSET, 1981a, A morphological and biochemical study of the interaction of (+)-cyanidanol-3 with the plasma membrane and protection against phalloidin and CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes, in : *International Workshop on (+)-cyanidanol-3 in diseases of the liver*, H.O. CONN (ed.), Academic Press and The Royal Society of Medicine, London, 21-25.

PERRISSOUD D., G. AUDERSET, O. REYMOND and M.F. MAIGNAN, 1981b, The effect of carbon tetrachloride on isolated rat hepatocytes : early morphological alterations of the plasma membrane, *Virchow's Arch.*, 35, 83-91.

PLAA G. 1986, Toxic responses of the liver, in : *Casarett and Doull's Toxicology, the basic science of poisons*, chap.10, 286-309, CASARETT L.J. and J. DOULL (eds.), Macmillan Publishing Company, New York, third edition.

POLI G., K. CHEESEMAN, T.F. SLATER and M.U. DIANZANI, 1981, The role of lipid peroxydation in CCl₄-induced damage to liver microsomal enzymes : comparative studies in vitro using microsomes and isolated liver cells, *Chem. Biol. Interactions*, 37, 13-24.

POLI G., E. GRAVELA, E. ALBANO and M.U. DIANZANI, 1979, Studies on fatty liver with isolated hepatocytes II. The action of carbon tetrachloride on lipid peroxydation, protein, and triglyceride synthesis and secretion, *Exp. Mol. Pathol.*, 30, 116-127.

POLI G., M. POLI CHIONO, T.F. SLATER, M.U. DIANZANI and E. GRAVELA, 1978, Effect of carbon tetrachloride on isolated rat liver cells : stimulation of lipid peroxydation and inhibitory action of free radical scavengers, *Biochem. Soc. Trans.*, 6, 589-591.

POLI G., E. CHIARPOTTO, E. ALBANO, F. BIASI, G. CECCHINI, E. GRAVELA and M.U. DIANZANI, 1983, Biochemical evidence for chemical and/or topographic differences in the lipoperoxidative process induced by CCl₄ and iron, *Chem. Biol. Interactions*, 43, 253-261.

PORTER N.A., 1984, Chemistry of lipid peroxydation, in : *Methods in Enzymology*, L. PARKER (ed.), Ac. Press Inc., New York, 105, 273-282.

PRYOR W.A., 1976, in : *Free radicals in biology*, vol 1, W.A. PRYOR (ed.), Ac. Press, New York.

- QUERAL A.E., A.B. DEANGELO and C.T. GARRET, 1984, Effect of different collagenases on the isolation of viable hepatocytes from rat liver, *Analytical Biochemistry*, 138, 235-237.
- RECKNAGEL R.O., 1967, Carbon tetrachloride hepatotoxicity, *Pharmacological Reviews*, 19 (2), 145-208.
- RECKNAGEL R.O., 1983, Minireview : A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity, *Life Sciences*, 33, 401-408.
- RECKNAGEL R.O. and A.K. GHOSHAL, 1966, Lipid peroxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity, *Laboratory Investigation*, 15 (1), 132-148.
- RECKNAGEL R.O. and E.A. GLENDE Jr., 1973, Carbon tetrachloride hepatotoxicity : an example of lethal cleavage, *CRITICAL Reviews in Toxicology*, 2, 263-297.
- RECKNAGEL R.O. and B. LOMBARDI, 1961, Studies of biochemical changes in subcellular particles of rat liver and their relationship to new hypothesis regarding pathogenesis of carbon tetrachloride fat accumulation, *J. Biol. Chem.*, 236, 564-569.
- RECKNAGEL R.O., E.A. GLENDE Jr. and A.M. HRUSZKEWYCZ, 1977, Chemical mechanisms in carbon tetrachloride toxicity, in : *Free Radicals in Biology*, vol.III, PRYOR W.A. (ed.), Acad. Press, New York, 97-132.
- REYNOLDS E.S., 1963, The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy, *J. Cell Biol.*, 17, 208-212.
- REYNOLDS E.S., R.J. TREINEN, H.H. FARRISH and M.T. MOLSSEN, 1984, Metabolism of (¹⁴C) carbon tetrachloride to exhaled, excreted and bound metabolites, *Biochem. Pharmacol.*, 33 (21), 3363-3374.
- SAKAMOTO K., M. TONOOKA, K. ABE, K. USAMI and T. KASAHARA, 1986, Comparative studies on rat primary cultured and isolated hepatocytes in the evaluation of a therapeutic agents for the liver disease, *Japan J. Pharmacol.*, 41, 424- 426.
- SANTONE K.S., D. ACOSTA, S.A. STAVCHANSKY and J.V. BRUCKNER, 1988, The use of primary cultures of postnatal rat hepatocytes to investigate carbon tetrachloride-induced cytotoxicity, in : *Proceedings of the International Symposium on "Liver cells and drugs"*, Rennes, July 7-10, 1987, A. GUILLOUZO (ed.), Les Editions INSERM/John Libbey EUROTEXT, London-Paris, 1988, vol. 164.
- SCHANNE F., R. PFAU and J. FARBER, 1980, Galactosamine-induced cell death in primary cultures of rat hepatocytes, *Amer. J. Pathol.*, 100, 25-36.

- SCHREIBER G. and M. SCHREIBER, 1973, The preparation of single cell suspensions from liver and their use for the study of protein synthesis, *Sub. Cell Biochem.*, 2, 321-383.
- SCHWARTZ D., 1963, Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes, FLAMMARION MEDECINE SCIENCES (ed.), Paris, troisième édition, 318 p.
- SCUDIERO D.A., R.H. SHOEMAKER, K.D. PAULL, A. MONKS, S. TIERNEY, T.H. NOFZIGER, M.J. CURRENS, D. SENIFF and M.R. BOYD, 1988, Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer Res.*, 48, 4827-4833.
- SEGLIN P.O., 1976, Preparation of isolated rat liver cells, in : *Methods in Cell Biology*, 13 , chap.4, 29-83.
- SHINOZUKA H., J.T. MARTIN and J.L. FARBER, 1973a, The induction of fibrillar nucleoli in the rat liver cells by D-galactosamine and their subsequent reformation into normal nucleoli, *J. Ultrastruct. Res.*, 44, 279-292.
- SHINOZUKA H., J.L. FARBER, Y. KONISHI and T. ANUKARAHONATA, 1973b, D-galactosamine and acute liver cell injury, *Fed. Proc.*, 32, 1516-1526.
- SLATER T.F., 1978, Mechanisms of protection, in : *Biochemical mechanism of liver injury*, chap.20, 745-801, Acad. Press, New York.
- SLATER T.F., 1982, Activation of carbon tetrachloride : chemical principles and biochemical significance, in : *Free Radicals, Lipid peroxidation and Cancer*, Mc BRIEN D.C.H. and T.F. SLATER (eds.), Acad. Press, New York, 243-274.
- SLATER T.F., 1984a, Free-radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.*, 222, 1-15.
- SLATER T.F., 1984b, Overview of methods used for detecting lipid peroxidation, in : *Methods in enzymology*, L. PARKER (ed.), Ac. Press. Inc., New York, 105, 283-293.
- SMITH M.T., H. THOR, P. HARTZELL and S. ORRENIUS, 1982, The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.*, 31 (1), 19-26.
- STACEY N.H. and J.C. FANNING, 1981, Ultrastructural changes in isolated hepatocytes after incubation with carbon tetrachloride, *Toxicology*, 22, 69-77.
- STACEY N. and B.G. PRIESTLY, 1978, Dose-dependant toxicity of CCl₄ in isolated rat hepatocytes and the effects of hepatoprotective treatments, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 45, 29-39.

STACEY N.H., H. OTTENWALDER and H. KAPPUS, 1982, CCl₄ induced lipid peroxydation in isolated rat hepatocytes with different oxygen concentrations, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 62, 421-427.

STANTONE K.S., D. ACOSTA, S.A. STAVCHANSKY and J.V. BRUKNER, 1988, The use of primary cultures of postnatal rat hepatocytes to investigate carbon tetrachloride-induced cytotoxicity, 221-234, in : *Proceedings of the International Symposium on "Liver cells and drugs"*, Rennes on July 7-10, 1987, A. GUILLOUZO (ed.), Les Editions INSERM and J.L. EUROTEXT, London-Paris, 494 p.

STERMANN R., S.R. WAGLE and K. DECKER, 1978, Inverse effects of D-galactosamine or inorganic phosphate on glycogenolysis in isolated rat hepatocytes, *Eur. J. Biochem.*, 88, 79-85.

STOJANOV M. and N. NAJKIC-SINGH, 1982, Optimal conditions for the isolation of hepatocytes and Kupffer cells from rat liver, *Acta Veterinaria*, 32 (4), 197-204.

SYAMASUNDAR K.V., B. SINGH, R.S. THAKUR, A. HUSAIN, Y. KISO and H. HIKINO, 1985, Antihepatotoxic principles of *Phyllanthus niruri* herbs, *Journal of Ethnopharmacology*, 14, 41-44.

TRAN-THI T.A., J. PHILLIPS, H. FALKS and K. DECKER, 1985, Toxicity of D-galactosamine for rat hepatocytes in monolayer culture, *Exp. Mol. Pathol.*, 42, 89-116.

TYSON C.A., C. MITOM and J. KALIKODA, 1980, Evaluation of hepatocytes isolated by a non perfusion technique in a prescreen for cytotoxicity, *J. Toxicol. Environ. Health*, 6, 197-205.

TYSON C.A., D.L. STORY and R.J. STEPHENS, 1983, Ultrastructural changes in isolated rat hepatocytes exposed to different CCl₄ concentrations, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114 (2), 511-517.

ULLRISH D. and K.W. BOCK, 1984, Inhibition of glucuronide formation by D-galactosone or D-galactosamine in isolated hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.*, 33 (11), 1827-1830.

VALENZUELA A., R. GUERRA and L.A. VIDELA, 1986, Antioxydant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3 : comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *Planta Medica*, 438-440.

VERAIN A., 1988, *Les phytomédicaments*, Industrie.Santé, 134, 13-18.

WAGLE S.R. and W.R. INGEBRETSEN Jr., 1975, Isolation, purification and metabolic characteristics of rat liver hepatocytes, in : *Methods in Enzymology*, 35, 579-594.

WAGNER H., B. GEYER, M. FIEBIG, Y. KISO and H. HIKINO, 1986, Isobutrin and butrin, the antihepatotoxic principles of *Butea monosperma* flowers, *Planta Medica*, 0 (2), 77-79.

- WALLER R.L., E.A. GLENDE Jr. and R.O. RECKNAGEL, 1983, Carbon tetrachloride and bromotrichloromethane toxicity : dual role of covalent binding of metabolic cleavage products and lipid peroxydation in depression of microsomal calcium sequestration, *Biochem. Pharmacol.*, 32, 1613-1617.
- WANG D., E. VERNEY and H. SIDRANSKY, 1985, Protective effect of tryptophan and cysteine against carbon tetrachloride-induced liver injury, *Exp. Mol. Pathol.*, 43 (3), 364-374.
- WANG S.R., G. RENAUD, J. INFANTE, D. CATALA and R. INFANTE, 1985, Isolation of rat hepatocytes with EDTA and their metabolic functions in primary culture, *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 21 (9), 526-530.
- WEDDLE C.C., K.R. HORNBROOK and P.B. McCAY, 1976, Lipid peroxydation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to carbon tetrachloride, *J. Biol. Chem.*, 251 (16), 4973-4978.
- WILLIAMS G.M., 1977, The detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures, *Cancer Res.*, 37, 1845-1851.
- YANG L.L., K.Y. YEN, Y. KISO and H. HIKINO, 1987, Antihepatotoxic actions of formosan plant drugs, *Journal of Ethnopharmacology*, 19 (1), 103-110.
- YOUNES M. and C.P. SIEGERS, 1984, Interrelation between lipid peroxydation and other hepatotoxic events, *Biochem. Pharmacol.*, 33 (13), 2001-2003.
- YOUNES M., M. ALBRECHT and C.P. SIEGERS, 1983, Interrelation between lipid peroxydation and lysosomal enzyme release in the presence of carbon tetrachloride, cumen hydroperoxyde or thioacetamide, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 40 (1), 121-132.
- ZIMMERMAN H.L., 1978, *Hepatotoxicity*, Appleton-Century-Crofts, New York.

ANNEXE 1

Solutions utilisées pour la perfusion du foie de rat.

1. Solution de lavage du foie.

Solution saline de Hanks sans Ca++ ni Mg++ (Flow ou Gibco)
Gentamycine 0,05 mg/ml (Flow)
Hépes 10 mM (Sigma)
Soude 1 N (Prolabo), QSP amener le pH à 7,35
EGTA 0,5 mM (Sigma)
Filtrer sur membrane de 0,22 um

2. Solution de dissociation du foie.

Milieu de Williams WME incomplet dont la préparation est indiquée annexe 21 (Flow ou Vietech)
CaCl₂ 5 mM (Prolabo)
Collagénase 0,25 % (Boehringer) ou 160 U/ml (Sigma type I)
Hépes 10 mM (Sigma)
Soude 1 N (Prolabo), QSP amener le pH à 7,35
Filtrer sur membrane de 0,45 um

ANNEXE 2

Milieux utilisés pour les hépatocytes en culture primaire.

1. Milieu de Williams.

Milieu de Williams WME liquide, stérile x1 (Flow ou Vietech)
Streptomycine / Pénicilline (Boehringer) 0,1 mg/ml et 100 UI/ml
L-glutamine 200 mM (Gibco) 2 mM
Sérum de veau nouveau né (Séromed) ou Sérum de foetal (Jacques Boy) 10 %.

2. Milieu essentiel minimum de Eagle.

Milieu essentiel minimum de Eagle avec sels de Earle EMEM liquide stérile x1 (Flow ou Gibco).
Streptomycine / Pénicilline (Boehringer) 0,1 mg/ml et 100 UI/ml
L-glutamine 200 mM (Gibco) 2 mM
Acides aminés non essentiels x100 (Flow) 1%.
Sérum de veau nouveau né non décomplémenté (Séromed) ou Sérum de foetal décomplémenté au bain marie 45 minutes à 56 degrés Celcius (Jacques Boy) 10 %.

3. Milieu de Leibowitz.

Milieu de Leibowitz L15 liquide, stérile x1 (Gibco).
Streptomycine / Pénicilline (Boehringer) 0,1 mg/ml et 100 UI/ml
L-glutamine 200 mM (Gibco) 2 mM
Tryptose phosphate broth (Flow) 10 %.
Sérum de veau nouveau né non décomplémenté (Séromed) ou Sérum de foetal décomplémenté au bain marie 45 minutes à 56 degrés Celcius (Jacques Boy) 10 %.

Ce milieu ne nécessite pas de CO₂ pour maintenir le pH.

4. Adjuvants.

Pour favoriser l'attachement des hépatocytes au support on peut ajouter aux milieux de l'insuline (Sigma) 10⁻⁵ M.
Pour maintenir le taux de cytochromes P450 on peut ajouter aux milieux de l'hydrocortisone hémisuccinate (Sigma) 10⁻⁶ M.

ANNEXE 3

Tapissage des boites de culture par le collagène.

1. Préparation de la solution de collagène.

Collagène de queue de rat (Sigma type VII) 1 mg/ml d'eau purifiée
Chauffer à 37 degrés Celcius et agiter au vortex jusqu'à
dissolution du collagène. Ajouter éventuellement 0,4 % d'HCL 5 N
pour faciliter la solubilisation.
Filtrer sur acrodisque 0,22 um.
Conserver à -20 degrés Celcius.

2. Méthode.

Déposer 50 ul de cette solution décongelée par boite de Pétri de
60 mm de diamètre (Falcon 3002) et étaler la goutte sur le fond
de la boite au moyen d'un rubber policeman.
Stocker 24 heures à 4 degrés Celcius et effectuer un double
lavage des boites avec du milieu de culture ou une solution
saline avant d'ensemencer les hépatocytes.

ANNEXE 4

Résultats de validation du dosage de l'albumine de rat.

1. Radiomarquage de l'albumine sérique de rat.

Le protocole de radiomarquage proposé met en présence $4,6 \cdot 10^{-10}$ mole de Na^{125}I et $3,1 \cdot 10^{-10}$ mole d'albumine. On peut ainsi espérer fixer en moyenne 1,5 atomes d'iode 125 par molécule d'albumine.

- Calcul du rendement de radiomarquage :

volume du pool = 2,4 ml (500 000 cpm/ul)

concentration protéique du pool = $\frac{20}{2,4 \cdot 10^3} = 8,33 \cdot 10^{-3}$ ug/ul

radioactivité spécifique = $\frac{50\,000}{8,33 \cdot 10^3} = 6 \cdot 10^7$ cpm/ug

soit $6 \cdot 10^7 \times 6,5 \cdot 10^{-7} = 39$ uCi/ug

rendement = $\frac{39 \times 4,6 \cdot 10^{-13}}{1,54 \cdot 10^{-11}} \times 100 = 117 \%$

(sachant que 1 ug d'albumine correspond à $1,54 \cdot 10^{-11}$ mole).

Ainsi 1,17 atomes d'iode 125 ont été fixés par molécule d'albumine, 80% de l'iode 125 a été fixée sur l'albumine à radiomarquer.

2. Détermination de la concentration "de travail" de l'anticorps polyclonal de mouton dirigé contre l'albumine sérique de rat.

La quantité d'albumine radiomarquée (traceur) introduite dans chaque tube étant constante (environ 10 000 cpm/tube) le titrage de l'anticorps anti-albumine a été réalisé afin de déterminer la concentration en anticorps qui fixe 50% de la radioactivité immunologiquement réactive totale.

La concentration ainsi déterminée est appelée concentration "de travail" de l'anticorps, car celle-ci permet un déplacement optimal du traceur par de l'albumine "froide" en solution (en effet le déplacement n'est possible qu'en défaut

La concentration de travail (titre de l'anticorps) a été déterminée d'après la courbe de titrage de l'anticorps (figure 49). Elle est égale à 60 ng/ml. Ainsi 100 ul d'anticorps anti-albumine à 60 ng/ml dans le tampon PB/gélatine doivent être introduits dans chaque tube pour réaliser le dosage de l'albumine sérique de rat.

3. Courbe standard d'étalonnage de l'albumine sérique de rat.

La courbe standard d'étalonnage est linéaire en système logit/log entre 3,9 et 250 ng/ml (figure 50). La sensibilité, exprimée en dose d'albumine qui diminue de 10% le signal, est de 3,9 ng/ml soit de 390 pg par dosage ($6 \cdot 10^{-15}$ mole/dosage).

4. Performances du dosage.

41. Spécificité.

L'anticorps polyclonal ne reconnaît pas l'albumine sérique bovine (figure 51) donc cette molécule qui est présente en grande quantité dans les milieux de culture ne risque pas d'interférer dans le dosage. Parce que la droite standard d'étalonnage couvre l'intervalle compris entre 3,9 et 250 ng/ml et que les concentrations en albumine sérique de rat dans les milieux de culture sont de l'ordre du ug/ml ou de la dizaine de ug/ml, il convient de diluer les échantillons au moins 100 fois. Or les droites d'étalonnage dans le milieu de culture dilué au 1/100 et dans le tampon d'essai "PB/gélatine" sont confondues (figure 52) aussi ne réalise-t-on qu'une gamme standard dans le tampon d'essai.

42. Sensibilité.

La sensibilité du dosage est de 3,9 ng/ml soit de 390 pg/tube ou $6 \cdot 10^{-15}$ mole/tube car la prise d'essai est de 100 ul.

43. Exactitude.

431. Test de surcharge.

a) Surcharge/points de la gamme

ALBUMINE AJOUTEE (ng/ml)	CONCENTRATIONS THEORIQUES (ng/ml)	CONCENTRATIONS MESUREES (ng/ml)	% RECUPERATION
-	-	7,8	-
10	8,9	7,0	79
100	53,9	47,0	87
200	103,9	128,0	123

-	-	31,2	-
10	20,6	18,0	87
100	65,6	80,0	122
200	115,6	160,0	138

-	-	125,0	-
10	67,5	100,0	148
100	112,5	140,0	124
200	162,5	220,0	135
<u>MOYENNE</u> =			116%

b) Surcharge/échantillons dilués au moins au 100^e

ALBUMINE AJOUTEE (ng/ml)	CONCENTRATIONS THEORIQUES (ng/ml)	CONCENTRATIONS MESUREES (ng/ml)	% RECUPERATION
-	-	60	-
10	35	45	129
100	80	130	163
200	130	180	138

-	-	64	-
10	37	30	81
100	82	92	112
200	132	145	110

432. Test de dilution.

DILUTIONS	CONCENTRATIONS THEORIQUES (ng/ml)	CONCENTRATIONS MESUREES (ng/ml)	% RECUPERATION
100e	-	170	-
200e	85	96	113
400e	42,5	43	101
800e	21,3	23	108

100e	-	165	-
200e	82,5	75	91
400e	41,3	42	102
800e	20,6	18	87

100e	-	180	-
200e	90	110	122
400e	45	54	120
800e	22,5	26	115
<u>MOYENNE</u> =			107%

Le test a été réalisé à l'aide de 3 échantillons.

44. Précision.

441. Répétabilité (intra-essai).

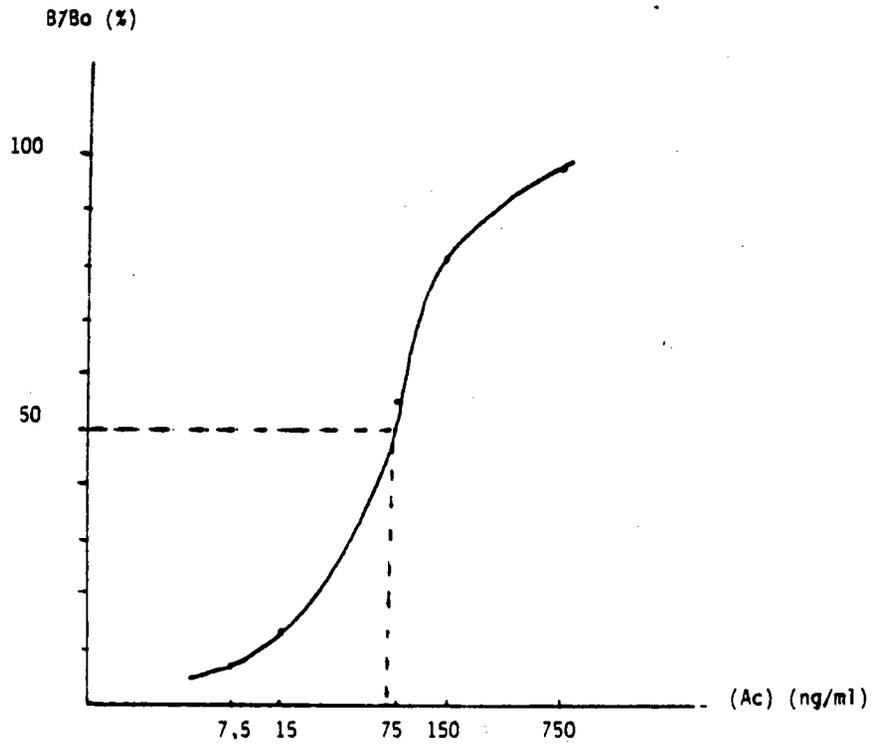
ECHANTILLONS	VALEUR MOYENNE (ng/ml)	ECART-TYPE (ng/ml)	COEFICIENT DE VARIATION %
<u>Pools:</u>			
1 n=6	123	3,9	3,2
2 n=6	115	12,1	10,5
3 n=4	141	9,5	6,7

442. Reproductibilité (inter-essai).

La reproductibilité (inter-essai) n'a pas été étudiée.

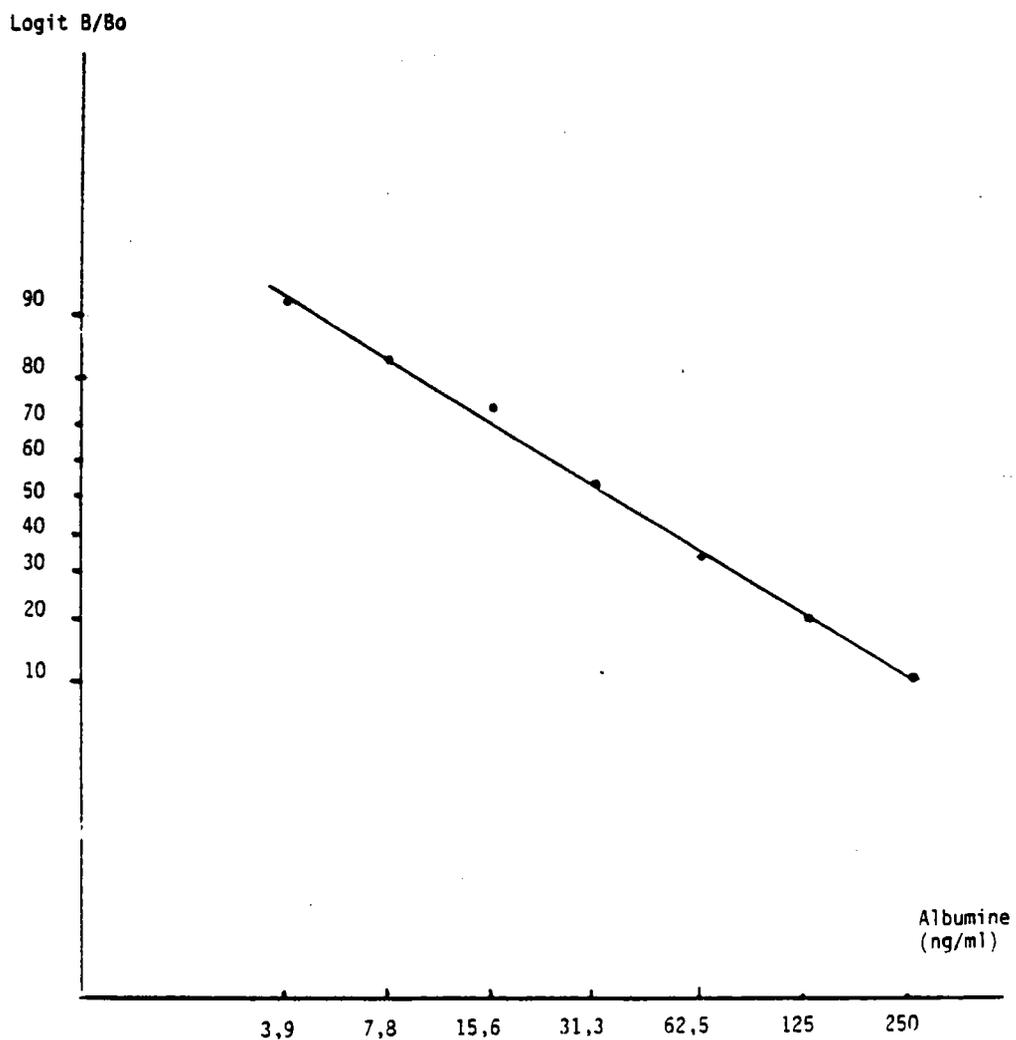
5. Conclusion.

Sous réserve d'une bonne reproductibilité inter-essai, le dosage RIA de l'albumine sérique de rat mis au point permet de doser l'albumine sérique de rat présente dans les surnageants de culture d'hépatocytes de rat de manière spécifique et sensible.



B = Radioactivité mesurée - bruit de fond
Bo = Radioactivité immunologiquement réactive totale - bruit de fond

Figure 49 : TITRAGE DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-ALBUMINE DE RAT.



B = Radioactivité mesurée - bruit de fond
Bo = Radioactivité mesurée en l'absence d'albumine "froide" - bruit de fond

Figure 50 : DROITE STANDARD D'ETALONNAGE DE L'ALBUMINE DE RAT.

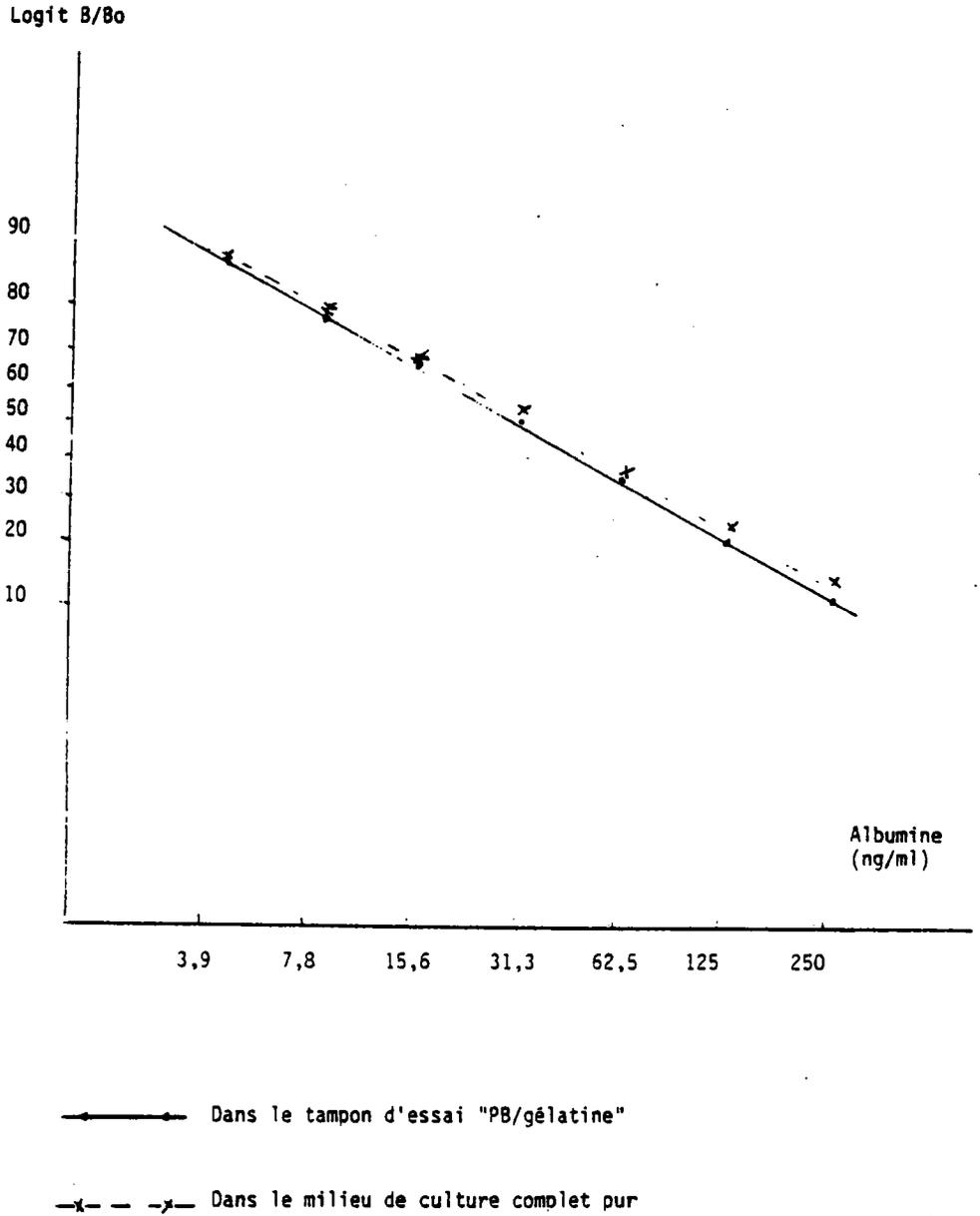


Figure 51 : DROITES STANDARDS D'ETALONNAGE DE L'ALBUMINE DE RAT.

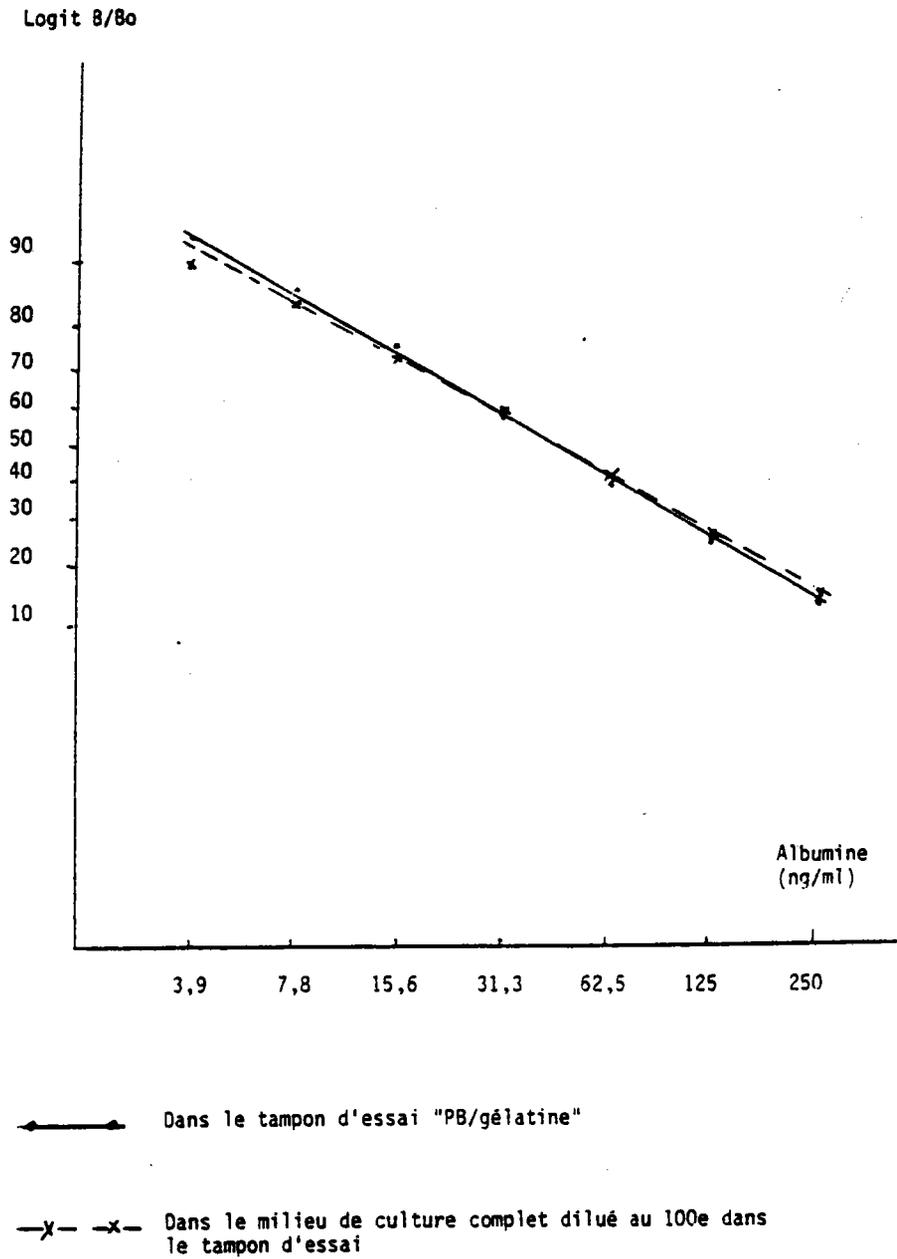


Figure 52 : DROITES STANDARDS D'ETALONNAGE DE L'ALBUMINE DE RAT.

ANNEXE 5

Résultats de validation du dosage de l'albumine humaine

1. Radiomarquage de l'albumine sérique humaine.

Le protocole de radiomarquage proposé met en présence $4,6 \cdot 10^{-10}$ mole de Na^{125}I et $3,3 \cdot 10^{-10}$ mole d'albumine. On peut ainsi espérer fixer en moyenne 1,4 atomes d'iode 125 par molécule d'albumine.

- Calcul du rendement de radiomarquage :

volume du pool = 30 ml (30 000 cpm/ul)

concentration protéique du pool = $\frac{20}{30 \cdot 10^3} = 6,67 \cdot 10^{-4}$ ug/ul

radioactivité spécifique = $\frac{30\ 000}{6,67 \cdot 10^4} = 4,5 \cdot 10^7$ cpm/ug

soit $4,5 \cdot 10^7 \times 6,5 \cdot 10^{-7} = 29,25$ uCi/ug

rendement = $\frac{29,25 \times 4,6 \cdot 10^{-13}}{1,66 \cdot 10^{-11}} \times 100 = 81 \%$

(sachant que 1 ug d'albumine correspond à $1,66 \cdot 10^{-11}$ mole).

Ainsi 0,8 atomes d'iode 125 ont été fixés par molécule d'albumine, 60% de l'iode 125 a été fixée sur l'albumine à radiomarquer.

2. Détermination de la concentration "de travail" de l'anticorps polyclonal de mouton dirigé contre l'albumine sérique de rat.

La quantité d'albumine radiomarquée (traceur) introduite dans chaque tube étant constante (environ 10 000 cpm/tube) le titrage de l'anticorps anti-albumine a été réalisé afin de déterminer la concentration en anticorps qui fixe 50% de la radioactivité immunologiquement réactive totale.

La concentration ainsi déterminée est appelée concentration "de travail" de l'anticorps, car celle-ci permet un déplacement optimal du traceur par de l'albumine "froide" en solution (en effet le déplacement n'est possible qu'en défaut d'anticorps par rapport à l'albumine radiomarquée), tout en maintenant un signal initial suffisant pour apprécier ledit déplacement.

La concentration de travail (titre de l'anticorps) a été déterminée d'après la courbe de titrage de l'anticorps (figure 53). Elle est égale à 40 ng/ml. Ainsi 100 ul d'anticorps anti-albumine à 40 ng/ml dans le tampon PB/gélatine doivent être introduits dans chaque tube pour réaliser le dosage de l'albumine sérique humaine.

3. Courbe standard d'étalonnage de l'albumine sérique humaine.

La courbe standard d'étalonnage est linéaire en système logit/log entre 1,95 et 500 ng/ml (figure 54). La sensibilité, exprimée en dose d'albumine qui diminue de 10% le signal, est de 2,7 ng/ml soit de 27 pg par dosage ($4,5 \cdot 10^{-15}$ mole/dosage).

4. Performances du dosage.

41. Spécificité.

L'anticorps polyclonal ne reconnaît pas l'albumine sérique bovine donc cette molécule qui est présente en grande quantité dans les milieux de culture ne risque pas d'interférer dans le dosage. Parce que la droite standard d'étalonnage couvre l'intervalle compris entre 1,95 et 500 ng/ml et que les concentrations en albumine sérique humaine dans les milieux de culture sont de l'ordre du ug/ml ou de la dizaine de ug/ml, il convient de diluer les échantillons au moins 100 fois.

42. Sensibilité.

La sensibilité du dosage est de 2,7 ng/ml soit de 270 pg/tube ou $4,5 \cdot 10^{-15}$ mole/tube car la prise d'essai est de 100 ul.

43. Exactitude.

431. Test de surcharge.

- Surcharge/échantillons dilués

ALBUMINE AJOUTEE (ng/ml)	CONCENTRATIONS THEORIQUES (ng/ml)	CONCENTRATIONS MESUREES (ng/ml)	% RECUPERATION
-	-	82,7	-
7,8	45,3	50,0	110
31,2	57,0	75,0	132
125	103,9	119,0	115

-	-	10,6	-
7,8	9,2	11,3	123
31,2	20,9	23,9	114
125	67,8	71,0	105

-	-	37,8	-
7,8	22,8	19,7	86
31,2	34,5	33,4	97
125	81,4	80,6	99

			<u>MOYENNE</u> = 109 + 13 %

432. Test de dilution.

DILUTIONS	CONCENTRATIONS THEORIQUES (ng/ml)	CONCENTRATIONS MESUREES (ng/ml)	% RECUPERATION
400e	-	82,7	-
800e	41,3	41,7	101
1600e	20,7	16,6	80

50e	-	60,7	-
100e	30,4	33,7	111
200e	15,2	15,0	99
400e	7,6	7,8	103
800e	3,8	4,0	105

100e	-	96,5	-
200e	48,3	48,6	101
400e	24,1	24,1	100
800e	12,1	11,1	93
<u>MOYENNE</u> =			99 %

Le test a été réalisé à l'aide de 3 échantillons.

44. Précision.

441. Répétabilité (intra-essai).

ECHANTILLONS	VALEUR MOYENNE (ng/ml)	ECART-TYPE (ng/ml)	COEFFICIENT DE VARIATION %
au 400e, n=10	64,7	3,8	5,8
au 3200e, n=10	8,8	0,7	8,0
au 50e, n=10	76,6	4,7	6,1
au 800e, n=10	10,6	0,75	7,1
au 100e, n=10	105,6	8,4	7,9
au 1600e, n=10	9,5	0,6	6,2
			MOYENNE = 6,9 %

442. Reproductibilité (inter-essai).

La reproductibilité (inter-essai) est en cours d'évaluation.

5. Conclusion.

Sous réserve d'une bonne reproductibilité inter-essai, le dosage RIA de l'albumine sérique humaine mis au point permet de doser l'albumine sérique humaine présente dans les surnageants de culture d'hépatocytes humains de manière spécifique et sensible.

EQUATION:
 $\text{LOGIT}(Y) = 3.062 \text{ LOG}_{10}(X) - 4.903$

$r = 1.00$

Liaison significative (P inf 5):
 $P = 0.00 \%$

Linearité admissible (P sup 95) :
 99.47%

ED50 :113.263

ED60 :39.9302

ED20 :14.0771

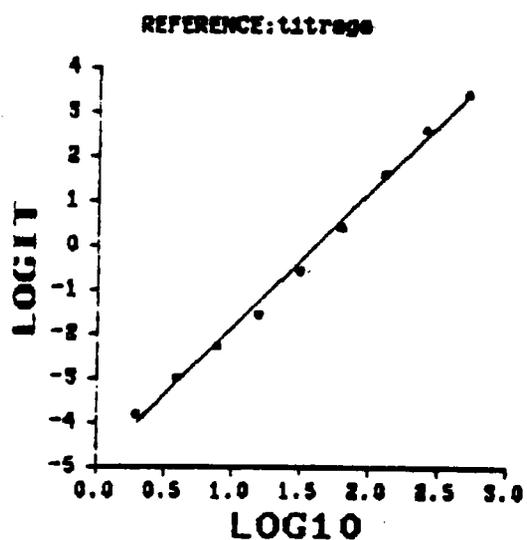


Figure 53 : TITRAGE DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-ALBUMINE HUMAINE.

EQUATION:
 $\text{LOGIT}(Y) = -2.291 \text{ LOG}_{10}(X) + 3.233$
 $r = -1.00$
Liaison significative (P inf 5):
P = 0.00 %
Linearité admissible (P sup 95) :
99.47 %
ED50 : 6.4019
ED60 : 26.7911
ED20 : 103.903

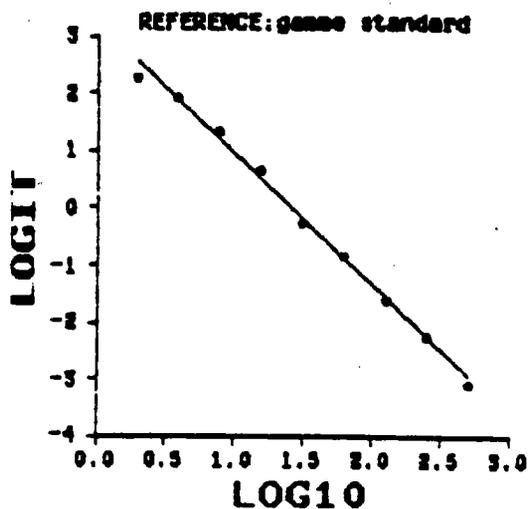


Figure 54 : DROITE STANDARD D'ETALONNAGE DE L'ALBUMINE HUMAINE.

ANNEXE 6

Recherche d'une toxicité aiguë chez la souris (DL 50)

La recherche d'une toxicité aiguë chez la souris a été menée selon la norme utilisée en toxicologie c'est à dire une dose supérieure à la DL 50 et deux doses infra DL 50 (calculées en progression géométrique de raison 2).

Les doses ont été déterminées en tenant compte de résultats provenant d'une étude précédente effectuée sur un autre lot d'extrait aqueux brut d'Eupatoire pour lequel une DL 50 = 8,2 g de plante sèche/kg avait été mesurée lors d'un traitement par voie IP.

1. Matériel et méthode.

11. Animaux.

Souris Swiss (Iffa Credo) E.O.P.S. âgées de 9 semaines et acclimatées durant deux semaines dans l'animalerie du laboratoire avant le test. Stabulation en cage de 5 animaux repartis au hasard à leur arrivée. Les animaux sont nourris (croquettes M 25 C Extralabo) et abreuvés avec de l'eau de ville *ad libitum*, le cycle nycthémeral est de 12 heures.

12. Conditions d'administration des produits.

Volume d'injection en IP = 10 ml/kg de souris.
Solvant = sérum physiologique à 0,9 % de NaCl.
Concentrations exprimées en masse de plante sèche/kg/10 ml.
Les mortalités ainsi que les poids cumulés/cage des animaux sont relevés aux temps 15 minutes; 1, 2, 4 heures puis quotidiennement durant 14 jours après le traitement.

2. Résultats.

Les résultats sont consignés dans les tableaux XXXIV, XXXV, XXXVI et XXXVII. Aucune mortalité n'a été relevée aux trois doses testées avec les préparations d'Eupatoire E 5141-3A et RT 1096.

Les observations comportementales révèlent une diminution de l'activité des animaux avec démarche anormale et fermeture des paupières chez les souris traitées avec les fortes doses de produit (10 g/kg). Les animaux ont retrouvé une activité normale au bout de 48 heures après le traitement.

T O X I C I T E A I G U E

N°	PRODUIT	DOSE g/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
				1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	E 5141-3A	2,5	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			POIDS CUMULES	159	-	-	-	162	164	167	-	166	172	-	173	-	171	-	178	177	177
2	E 5141-3A	5	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			POIDS CUMULES	158	-	-	-	150	156	158	-	163	171	-	173	-	175	-	183	181	178
3	E 5141-3A	10	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			POIDS CUMULES	159	-	-	-	150	153	157	-	164	169	-	174	-	173	-	177	175	175
4			MORTALITE																		
			POIDS																		
5			MORTALITE																		
			POIDS																		

5 SOURIS SWISS MALES/LOT
POIDS
AGE 9 SEMAINES

DATE 3/09/86
HEURE 15^H30
MANIP.

PRODUIT E 5141-3A
REP.
FORME LYOPHILISAT

Tableau XXXIV : RECHERCHE DE LA DL 50 DE L'EXTRAIT E 5141-3A CHEZ LA SOURIS MALE.

TOXICITE AIGUE

N°	PRODUIT	DOSE g/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
				1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	E 5141-3A	2,5	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			POIDS CUMULES	140	-	-	-	141	145	148	-	147	151	-	151	-	148	154	156	154	150
2	E 5141-3A	5	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			POIDS CUMULES	139	-	-	-	134	139	141	-	145	148	-	146	-	144	151	151	153	155
3	E 5141-3A	10	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			POIDS CUMULES	143	-	-	-	136	138	141	-	148	148	-	148	-	152	157	154	157	157
4			MORTALITE																		
			POIDS																		
5			MORTALITE																		
			POIDS																		

5 SOURIS SWISS FEMELE/LOT
POIDS
AGE 9 SEMAINES

DATE 3/09/86
HEURE 15^H30
MANIP.

PRODUIT E 5141-3A
REF.
FORME LYOPHILISAT

Tableau XXXV : RECHERCHE DE LA DL 50 DE L'EXTRAIT E 5141-3A CHEZ LA SOURIS FEMELE.

TABLEAU VII

T O X I C I T E A I G U E

N°	PRODUIT	DOSE g/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS															
				1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1	RT 1096	2,5	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			POIDS CUMULES	161	-	-	-	156	163	165	-	168	175	-	179	-	176	181	182	181	181	181	181
2	RT 1096	5	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			POIDS CUMULES	160	-	-	-	148	156	159	-	164	172	-	177	-	176	181	186	184	182	182	182
3	RT 1096	10	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	C
			POIDS CUMULES	168	-	-	-	148	159	163	-	168	173	-	177	-	179	186	187	188	188	190	190
4			MORTALITE																				
			POIDS																				
5			MORTALITE																				
			POIDS																				

5 SOURIS SWISS MALES/LOT
POIDS
AGE 9 SEMAINES

DATE 3/09/86
HEURE 15^h30
MANIP.

PRODUIT RT 1096
REF.
FORME Poudre INDUSTRIELLE

TABLIÉAU VIII

T O X I C I T É A I G U E

N°	PRODUIT	DOSE g/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS																
				1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
1	RT 1096	2,5	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			POIDS CUMULES	150	-	-	-	144	149	152	-	147	151	-	153	-	154	155	155	156	159			
2	RT 1096	5	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			POIDS CUMULES	139	-	-	-	132	142	146	-	144	150	-	153	-	148	156	157	159	161			
3	RT 1096	10	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			POIDS CUMULES	143	-	-	-	129	134	137	-	140	145	-	149	-	146	151	155	154	155			
4			MORTALITE																					
			POIDS																					
5			MORTALITE																					
			POIDS																					

5 SOURIS SWISS FEMELES/LOT
POIDS
AGE 9 SEMAINES

DATE 3/09/86
HEURE 15^H30
MANIP.

PRODUIT RT 1096
REF.
FORME POUFRE INDUSTRIELLE

Tableau XXXVII : RECHERCHE DE LA DL 50 DE L'EXTRAIT RT 1096 CHEZ LA SOURIS FEMELLE.