



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie Animale قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Immunologie - Oncologie

Intitulé :

Etude des effets anti-addiction, hépato-protecteur et immuno-modulateur d'un nouveau analogue du baclofène

Présenté par : ZEGHINA Ibtissem

Le : 06/07/2017

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Dr. LATRECHE Asma (MCB-UFM Constantine1)

Rapporteuse : Dr. ELOUAR Ibtissem (MCA- UFM Constantine1)

Examinatrice : Dr.GHERIB Asma (MCB- UFM Constantine1)

Année universitaire 2016- 2017

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ




Remerciement :

A l'issue de la rédaction de ce mémoire, je suis convaincue que la recherche est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti chercheuse »

En préambule à ce mémoire, louange à Allah le tout miséricordieux pour son guide, son aide dans un parcours acharné envers le savoir scientifique et qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail, Merci DIEU.

Tout d'abord je remercie chaleureusement ma directrice Melle le docteur EL OUAR.I, pour son intérêt et son soutien, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant de m'encadrer, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et de m'avoir supporté dans tous les sens du terme. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail. Merci énormément pour votre confiance,



compréhension, gentillesse et de ton aide sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.

J'exprime mes remerciements également aux membres de jury chapotés par Dr. LATRECHÉ A. et Dr. GHÉRIB A. qui nous font l'honneur de faire partie du jury.

Mes vifs remerciements s'adressent à m'a famille, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours soutenus moralement, physiquement et financièrement.

Mes vifs remerciements s'adressent à tous mes enseignants sans exceptions.

Je remercie également Mr Madassi pour son aide, ces services, sa gentillesse et son soutien inestimable.

Mes remerciements vont aussi à Mr Bahri L., Melle Bahi A. et Mme Bouabi K., docteur vétérinaire, qui m'ont aidé et assisté à l'animalerie.

Mes vifs remerciements vont aussi Mr CHEBEL Brahim El Khalil le responsable de labo d'immuno pour son aide, sa collaboration et surtout sa gentillesse.

Je tiens à remercier vivement mon frère Mokhtari Mohamed Baddredine qui m'a beaucoup aidé dans la réalisation de mon mémoire. Un grand merci pour ton soutien, tes



conseils, ta disponibilité à tout moment j'ai besoin et ton aide.

Sans oublier mes deux frères et collègues Khelifa abderrezak et Boumaza abdelmoula qui ont été tout le temps présent avec moi, ils ont travaillé avec moi comme si on est un trinôme, merci beaucoup sans votre aide ce travail n'aurait pas pu être fait.

Je remercie aussi mon amie et ma sœur Foughalia Amina qui m'accompagnée à l'animalerie. Merci pour ton aide et tous les bons souvenirs.

Je tiens à remercier aussi toutes mes amies et tous les personnes proches de mon cœur pour leurs soutient et leurs encouragements.

A la fin je remercie tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.



Dédicace :

Je dédie ce travail à ma mère, mon père et mes sœurs pour leurs sacrifices, leurs encouragements et leur amour je vous aime très fort que dieu vous garde pour moi.

Je dédie ce travail à ma grand-mère, merci pour ta tendresse, tes câlins, tes conseils et tes prières. Je t'aime

Je dédie ce travail à la mémoire de mon grand père, mon roi, tu resteras toujours dans mon cœur RABI YARHMEK.

Je dédie ce travail aux mes adorables neveux Louay et Mohamed Islem et ma belle nièce Tasnim.

Je dédie ce travail à toute personne proche de mon cœur.

Je dédie ce travail à toute personne qui m'a enseigné et contribué à ma formation pendant toute ma carrière.

Je dédie ce travail aussi à tous mes amies et mes collègues que j'ai connu au cours de mon parcours

ZEGHINA Ibtissem

Table des matières :

I. Introduction	1
II. Partie bibliographique	3
Chapitre 1 : Alcool éthylique	3
1. Propriétés physico-chimiques	3
2. Propriétés pharmacocinétiques	3
3. Métabolisme de l'éthanol	4
4. Ethanol et toxicité hépatique	6
Chapitre 2 : Les maladies alcooliques de foie	9
1. Mécanisme de l'inflammation induit par l'alcool	9
2. Lésions histologiques de la maladie alcoolique du foie	11
2.1.La stéatose	12
2.2.Hépatite alcoolique	12
2.3.La fibrose	13
2.4.Cirrhose	14
Chapitre 3 : l'effet d'alcool sur le cerveau	15
1. Généralité : récepteur GABA	15
2. Alcool e récepteur GABA	16
III. Partie expérimentale	18
1. Matériel et méthodes	18
1.1.Matériel biologique	19
1.2.Baclofène	19
1.3.Analogue	19
2. Effet des deux analogues du récepteur GABA sur l'alcool-dépendance	20
2.1.Développement du modèle alcoolique	20
2.2.Effet des deux analogues du récepteur GABA sur la dépendance alcoolique	20
2.3.Effet des deux analogues du récepteur GABA sur le comportement des rattes	21
2.3.1. Test de champ ouvert (open Field)	21
2.3.2. Test light/dark box	21
2.4.Prélèvement	22
2.5.Analyse qualitative des protéines sériques	22
2.6.Effet des différents traitements sur les marqueurs de lésion hépatiques	23

2.6.1. Dosage de l'activité glutamyltransférase (γ GT)	23
2.6.2. Dosage de l'activité alanine-aminotransférase (ALT/TGP)	23
2.6.3. Dosage de l'activité aspartat-aminotransférase (AST/TGO)	24
3. Effet immuno-modulateur des deux analogues du récepteur GABA	25
3.1.Effet sur le taux des anticorps agglutinant	26
3.2.Effet sur immunité cellulaire	26
4. Etude statistique	26
IV. Résultats	27
V. Discussion	43
VI. Conclusion et perspectives	49
VII. Références bibliographiques	51

Liste des figures

Figure : 1	Les voies d'élimination de l'alcool éthylique	4
Figure : 2	Métabolisme hépatique de l'éthanol	6
Figure : 3	augmentation du rapport NADH/NAD ⁺	7
Figure : 4	Métabolisme de l'éthanol et lésions cellulaires apparentées	8
Figure : 5	Voie de signalisation LPS/TLR 4	10
Figure : 6	Mécanismes inflammatoires dans les maladies alcooliques du foie	10
Figure : 7	Histoire naturelle de la maladie alcoolique du foie. Le spectre des lésions hépatiques de la maladie alcoolique comprend la stéatose, l'hépatite, la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire	11
Figure : 8	Aspect histologique de l'hépatite alcoolique	12
Figure : 9	Physiologie de l'hépatite alcoolique	13
Figure : 10	Modèle d'accélération de la fibrogenèse engendrée par l'alcool	14
Figure : 11	Représentation schématique du récepteur GABA _A	16
Figure : 12	Interactions entre les récepteurs et les agonistes des neurotransmetteurs au niveau des synapses.	17
Figure : 13	La molécule du baclofène	19
Figure : 14	Image photographiée qui illustre le dispositif du test de comportement (open Field)	21
Figure : 15	Image photographiée qui illustre le dispositif du test light dark box	22
Figure : 16	Taux d'alcool consommé par les rattes exprimé en g/kg	27
Figure : 17	Variation de la consommation d'alcool (exprimée en g/kg) après traitement par le baclofène et son analogue (*significative comparativement au groupe traité par l'éthanol $p \leq 0.05$)	28
Figure : 18	L'effet du baclofène et son analogue sur le temps (s) passé dans la zone centrale au cours du test de champ ouvert (Open Field) (*significative $p \leq 0.05$)	29
Figure : 19	L'effet du baclofène et son analogue sur le temps (s) passé dans la zone périphérique au cours du test de champ ouvert (Open Field)	29
Figure : 20	L'effet du baclofène et son analogue sur le temps total (min) passé dans la lumière et l'obscurité au cours du test light dark box	30

Figure : 21	L'effet du baclofène et son analogue sur le temps du premier épisode (min) passé dans la lumière et l'obscurité au cours du test light dark box	30
Figure : 22	Effet du baclofène et son analogue sur l'activité de l'enzyme gamma GT (n≥3). (* <i>significative comparativement au contrôle</i> <i>*comparativement au groupe traité par éthanol p≤0.05</i>)	31
Figure : 23	Effet du baclofène et son analogue sur l'activité de l'enzyme TGO (n≥3). (* <i>significative comparativement au contrôle</i> <i>*comparativement au groupe traité par éthanol p≤0.05</i>)	33
Figure : 24	Effet du baclofène et son analogue sur l'activité de l'enzyme TGP (n≥3). (***) <i>hautement significative comparativement au groupe traité par éthanol p≤0.05</i>)	34
Figure : 25	Electrophérogramme des protéines sériques obtenue par électrophorèse capillaire: exemple d'un de nos échantillon (groupe contrôle)	35
Figure : 26	Effet du baclofène et son analogue sur le taux des protéines totales exprimé en (g/dl)	36
Figure : 27	Effet du baclofène et son analogue sur le taux d'albumine exprimé en (%)	36
Figure : 28	Effet du baclofène et son analogue sur le taux d'alpha 1 globuline exprimé en (%)	37
Figure : 29	Effet du baclofène et son analogue sur le taux d'alpha 2 globuline exprimé en (%)	37
Figure : 30	Effet du baclofène et son analogue sur le taux du beta 1 globuline exprimé en (%)	38
Figure : 31	Effet du baclofène et son analogue sur le taux du beta 2 globuline exprimé en (%)	38
Figure : 32	Effet du baclofène et son analogue sur le taux du gamma globuline exprimé en (%)	39
Figure : 33	Effet du baclofène et son analogue sur le taux d'anticorps agglutinats	40

- Figure : 34** Observation macroscopique après l'injection des globules rouges dans la patte droite chez la ratte après 24 h (A : œdème, B : gonflement, C : contrôle) **40**
- Figure : 35** Variation de l'épaisseur du pied droit après 24 h et 48 h de l'immunisation avec les globules rouge de lapin (***) hautement significative comparativement au contrôle, *significative comparativement GR) **41**
- Figure : 36** Variation de l'épaisseur du pied gauche après 24 h de l'immunisation avec les globules rouge de lapin. **42**

Liste des tableaux :

Tableau : 1	effet du baclofène et son analogue sur l'activité de l'enzyme gamma GT : comparaison par le test t de student (valeurs p, seuil de signification $\leq 0,05$)	32
Tableau : 2	effet du baclofène et son analogue sur l'activité de l'enzyme TGO: comparaison par le test t de student (valeurs p, seuil de signification $\leq 0,05$)	32
Tableau : 3	effet du baclofène et son analogue sur l'activité de l'enzyme TGO: comparaison par le test t de student (valeurs p, seuil de signification $\leq 0,05$)	34

Liste des abréviations :

ADH	Alcohol dehydrogenase
ADN	Deoxyribonucleic acid
ALD	Alcoholic liver disease
ALDH	Aldehydes dehydrogenases
AMP	Adenosine monophosphate
BZ	Benzodiazepines
CO₂	Carbon dioxide
CYP1A2	Cytochrome p450 1a2
CYP2E1	Cytochrome p450 2e1
CYP3A4	Cytochrome p450 3a4
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ERO	Reactive oxygen species
FeO	Ferrous oxide
GABA	γ -Aminobutyric acid
H₂O	Water
H₂O₂	Hydrogen peroxide
HIF	Hypoxia-inducible factor 1 alpha
I-CAM	Intercellular adhesion molecule
IL-10	Interleukins 10
JAK	Janus kinase
JNK	Jun N-terminal kinases
LPS	Lipopolysaccharide
MEC	Extracellular matrix
MEOS	The pathway of the microsomal oxidation system of ethanol
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NKT	Natural killer T
O₂-	Anion oxide
OH	Hydroxide
OF	Open Field

OMS	World Health Organization
PPAR α	Proliferator activated receptor α
SMAD 3	Mothers against decapentaplegic homolog 3
SNC	Central nervous system
SREBP-1	Sterolregulatory element-binding protein-1
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TGF β	Transforming growth factor
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
VLDL	Very low density lipoprotein
ROS	Reactive oxygen species

Introduction

Introduction

I. Introduction :

Le mot alcoolisme désigne les manifestations individuelles de l'intoxication par alcool éthylique et les problèmes sociaux que posent à la collectivité, les phénomènes psychologiques, pathologiques et accidentologique (Aubin et al., 2013).

L'alcoolisme est une maladie dévastatrice pour laquelle il n'existe toujours pas de traitement pharmacologique véritablement efficace (Ameisen et de Beaurepaire, 2010).

D'après le rapport 2014 de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la consommation abusive d'alcool est responsable de plus de 2,5 millions de décès prématurés par an et près de 4% de tous les décès dans le monde sont attribués à l'alcool. L'Algérie selon le même rapport arrive en 2^{ème} position dans la consommation d'alcool aux pays du Maghreb.

En outre, la consommation excessive d'alcool peut provoquer des lésions au niveau de l'organisme non seulement sur le système nerveux (Goujon et al., 2009). Mais aussi sur d'autres organes comme le foie (Roozenbeek et al., 2013).

Les maladies alcooliques du foie (MAF) résultent de la consommation chronique d'alcool. (Seki, 2016), elles regroupent un ensemble d'atteintes hépatiques commençant par une surcharge en graisse, appelée stéatose, à une maladie plus sévère, caractérisée par une inflammation est une fibrose progressive du parenchyme hépatique pouvant évoluer vers une cirrhose (Lanthier et Spahr, 2016).

Par ailleurs, le baclofène est un myorelaxant, un agoniste des récepteurs GABA_B, commercialisé en 1972 pour traiter les spasmes musculaires que l'on observe dans certaines maladies neurologiques, telles que la sclérose en plaque (De Beaurepaire R, 2011). Récemment, il a été émergé comme une pharmacothérapie pour la dépendance à l'alcool. Des études cliniques récentes ont suggéré que le traitement par le baclofène peut réduire la consommation, la promotion de l'abstinence d'alcool et l'atténuation des symptômes de sevrage (Ameisen et de Beaurepaire, 2010 ; Garbutt et al., 2010; Addolorato et Leggio, 2011; Agabio et al., 2012; Muzyk et al., 2012; Tyacke et al., 2010).

Ainsi, le baclofène est une molécule peu soluble dans l'eau avec un faible volume de distribution de l'ordre de 1 L/kg et une liaison plasmatique peu importante proche de 30 %.

Cependant, afin d'améliorer la solubilité, l'absorption du principe actif et réduire la toxicité de la molécule originale, nos collaborateurs de l'université d'Abu bakr bel kaid Tlemcen ont synthétisé un nouveau analogue du baclofène et notamment du récepteur GABA.

Introduction

Dans ce cadre, l'objectif de ce travail est de tester en premier lieu le nouveau composé et réaliser ensuite, une étude comparative entre les effets biologiques de la molécule originale, le baclofène et son nouveau analogue.

Notre étude comporte plusieurs aspects nous commençant d'abord par développer un modèle de dépendance alcoolique chez les rats sur lequel nous allons tester l'effet anti addiction des deux analogues du récepteur GABA.

Nous allons étudier ensuite, l'existence ou non d'un effet protecteur des deux composés contre les lésions hépatiques induites par l'alcool en mesurant l'activité enzymatique du gamma glutamyl-transpeptidase ou gamma glutamyl-tranférase (γ GT), de l'alanine aminotransférase (ALAT) et de l'aspartate aminotransférase (ASAT).

Ainsi afin de dépister l'existence d'un syndrome inflammatoire induit par les différents traitements un profil d'électrophorèse des protéines sérique a été réalisé.

Enfin, nous testons l'effet immuno-modulateur des deux composés vu que le baclofène est un médicament utilisée pour le traitement d'une maladie auto immune ; la sclérose en plaque. L'effet des deux agoniste du récepteur GABA sera étudié sur la réponse immunitaire humorale et cellulaire.

Partie
bibliographique

II. Partie bibliographique :

Chapitre 1 : l'alcool éthylique

1. Propriétés physico-chimiques :

L'éthanol CH₃-CH₂-OH est un composé aliphatique de faible poids moléculaire (46 g), légèrement soluble dans les lipides et complètement miscible à l'eau. C'est un alcool volatil, inflammable, agressif pour les muqueuses et de goût désagréable. Il ne peut donc être consommé que dilué sous forme de boissons alcooliques (Goullé et Guerbet, 2015).

L'éthanol se distribue rapidement dans tout l'organisme et peut franchir d'importantes membranes biologiques comme la barrière hémato encéphalique pour agir ensuite sur un grand nombre d'organes et de processus biologiques (Morel et Anger, 2012).

2. Propriétés pharmacocinétiques :

Les effets de l'alcool dépendent en grande partie de sa concentration dans le sang (alcoolémie) et par conséquent de la vitesse par laquelle il est absorbé et métabolisé dans l'organisme (Attignona et al., 2015).

- **Absorption** : l'éthanol est rapidement absorbé, par simple diffusion, dans l'estomac (20%) et les intestins (80%) (Mark, 2014).

-**Distribution** : il se distribue rapidement dans tout l'organisme, notamment dans les compartiments très vascularisés comme le cerveau, les poumons et le foie (Gicquel et al., 2016).

-**Elimination** : une faible proportion de l'éthanol est éliminée sous forme inchangée par la sueur, la respiration ou l'urine, mais la majeure partie est métabolisée au niveau du foie (Augsburger et al., 2016) (**fig.1**).

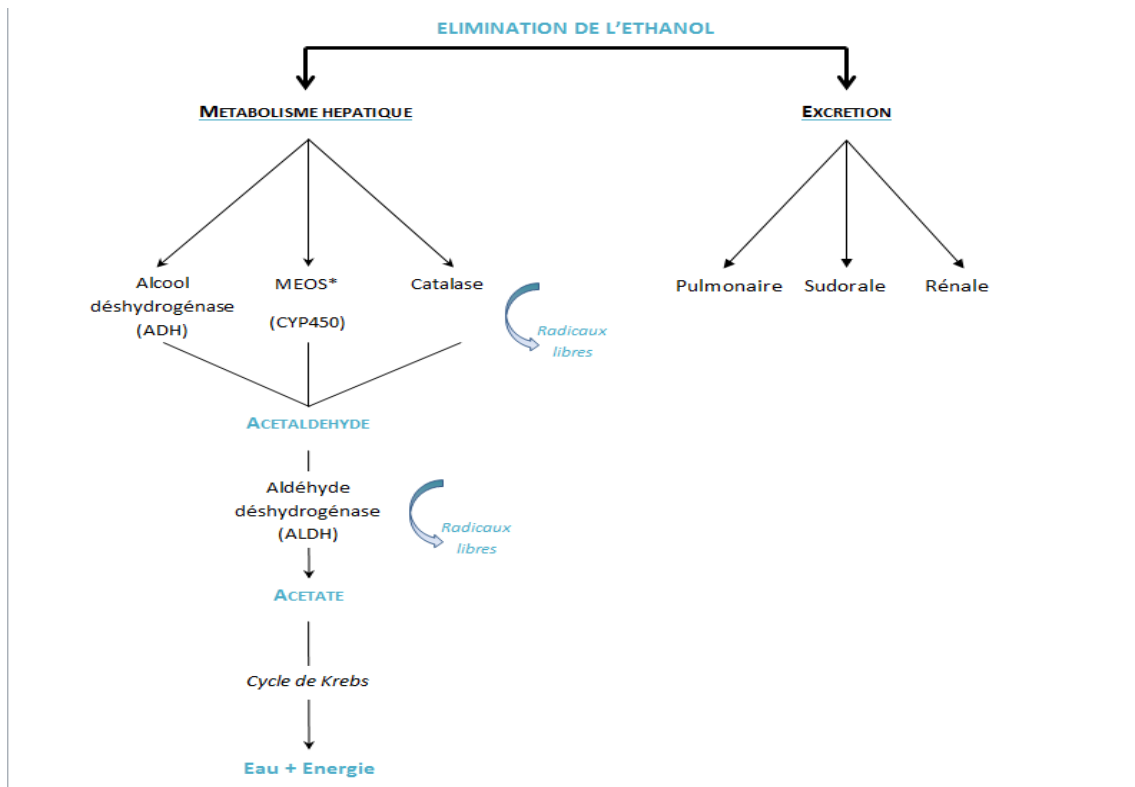


Figure 1: Les voies d'élimination de l'alcool éthylique (Huas et Rueff, 2005)

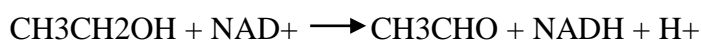
3. Métabolisme de l'éthanol :

Le métabolisme de l'éthanol se fait par oxydation principalement au niveau du foie. Néanmoins, d'autres organes peuvent participer comme les reins et le tractus gastro-intestinal. Le métabolisme hépatique élimine plus de 80 % de l'alcool ingéré grâce à trois grandes étapes :

Etape 1: oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde

L'éthanol C_2H_5OH est oxydé en acétaldéhyde CH_3CHO , métabolite hautement toxique, dans le cytoplasme de l'hépatocyte selon trois voies enzymatiques:

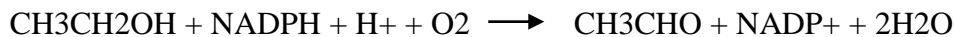
- **Voie d'oxydation par l'alcool déshydrogénase (ADH)**, enzyme cytosolique utilisant le NAD^+ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) comme cofacteur. Cette voie d'oxydation intervient lorsque l'alcool est consommé à faible dose (Voie principale).



- **Voie du système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS)** : intervient en cas d'alcoolémie très élevée ou en cas d'alcoolisation chronique.

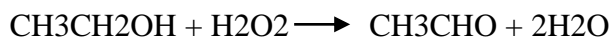
Cette voie utilise le cofacteur $NADPH$ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) et fait intervenir le cytochrome P450 2E1 et produit des radicaux libres $OH\cdot$. Ces

derniers vont participer d'une part à l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde et d'autre part ils vont participer aux mécanismes de toxicité de l'éthanol.



- **Voie de la catalase** : elle ne participe que par 2 % dans l'oxydation de l'éthanol. C'est une voie accessoire comme la précédente qui n'intervient qu'en cas d'alcoolémie chronique.

La voie de la catalase fait intervenir la xanthine oxydase, la catalase n'est active qu'en fonction de la quantité d'eau oxygénée produite au cours des réactions du métabolisme intermédiaire et parvenant au peroxysoxe. L'acétaldéhyde est ensuite métabolisé comme indiqué précédemment.



Etape 2 : oxydation de l'acétaldéhyde en acétate

L'acétaldéhyde CH_3CHO est catabolisé en acétate CH_3COO^- sous l'action de l'acétaldéhyde déshydrogénase (**ALDH**) mitochondriale, elle fait intervenir plusieurs isoformes du cytochrome P 450 (les CYP2E1, CYP1A2 et CYP3A4) situées dans le réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes

Etape 3 : oxydation de l'acétate en CO_2 et H_2O

L'acétate, produit dans le foie est libéré dans la circulation sanguine. Il est oxydé par les tissus périphériques en dioxyde de carbone (CO_2) et en eau (H_2O) au cours du cycle Krebs.

(Kintz et Raul, 2016) (**fig.2**)

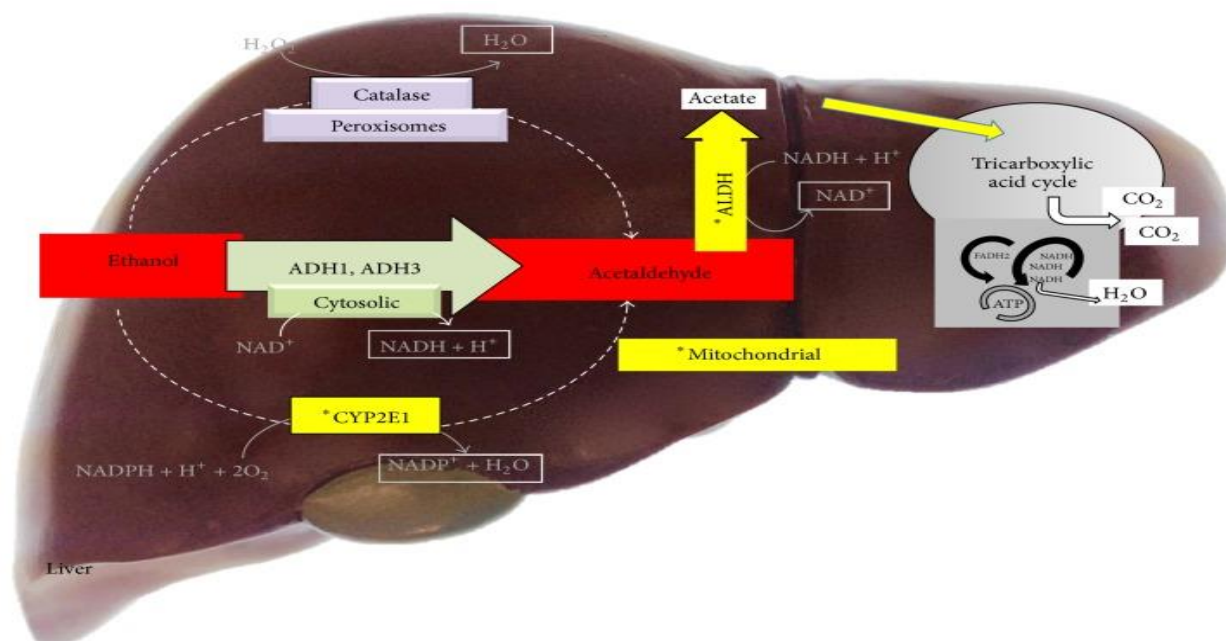


Figure2 : Métabolisme hépatique de l'éthanol. (Hernández et al., 2016)

4. Ethanol et toxicité hépatique :

- Augmentation du rapport NADH / NAD+ :

Le métabolisme oxydatif de l'alcool par les ADH et ALDH conduit à la réduction du coenzyme NAD⁺ en NADH, H⁺ et à une augmentation du rapport NADH, H⁺/NAD⁺ avec des conséquences cellulaires importantes. D'une part, pour rétablir l'équilibre redox de la cellule, le NADH, H⁺ doit être de nouveau oxydé par la chaîne respiratoire mitochondriale activée dans ces conditions. L'augmentation de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, avec le transfert d'électrons, est propice à la production d'espèces réactives d'oxygène. D'autre part, l'augmentation de la respiration induit une consommation plus importante d'oxygène. Les hépatocytes situés près des artères ont accès facilement à l'oxygène alors que les hépatocytes péri-veineux sont les premiers en carence d'oxygène. Elles sont plus sensibles à l'hypoxie et ce sont eux qui réalisent la majorité du métabolisme de l'éthanol lors du premier passage et qui expriment le plus de CYP2E1 (Teixeira-Clerc, 2014). Or l'activité du CYP2E1 consomme de l'oxygène ce qui aggrave d'autant plus le phénomène d'hypoxie. Chez les patients consommant de l'alcool de façon chronique, les hépatocytes péri-veineux sont ainsi les premiers atteints. En présence d'alcool, les macrophages du foie (cellules de Kupffer) sont activés, libérant de nombreuses molécules comme les prostaglandines E2 qui stimulent l'activité métabolique des hépatocytes. Ces

activités requièrent également de l'oxygène et contribuent également à favoriser l'hypoxie des hépatocytes (Lee YP et al., 2013). (Fig.3)

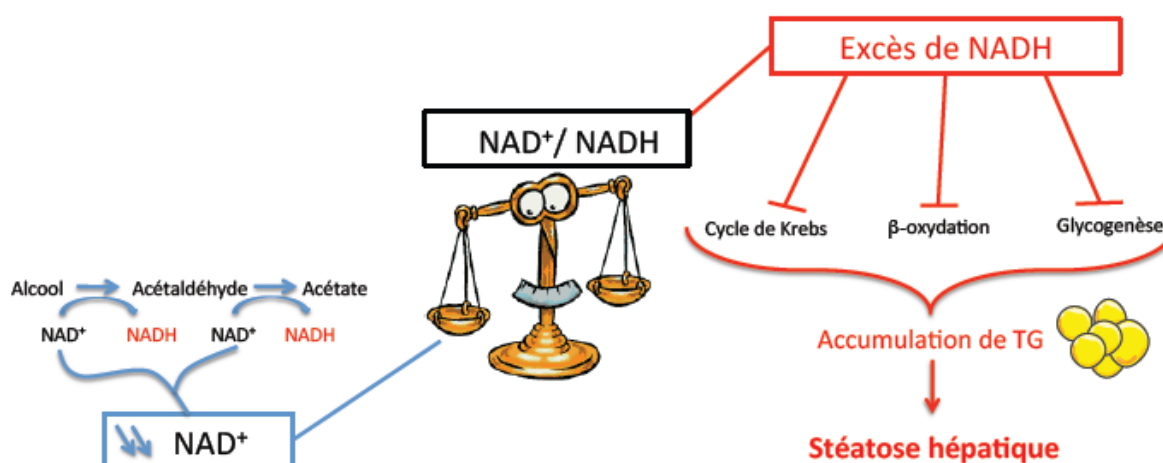


Figure 3: Les conséquences de l'augmentation du rapport $NADH / NAD^+$

- Production d'acétaldéhyde :

C'est un métabolite électrophile qui forme des adduits toxiques avec les macromolécules environnantes, il modifie la structure des protéines et produit des mutations au niveau de l'ADN nucléaire et mitochondrial (Ceni et al., 2014).

Il inhibe l'activation du facteur de transcription PPAR α (*proliferator activated receptor*) contrôlant des gènes responsables de l'oxydation des acides gras. Il active le facteur de transcription SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein 1*), intervenant dans la lipogénèse et stimule la synthèse de collagène et des composants de la matrice extracellulaire (ECM) à travers l'activation de la voie de signalisation TGF- β /SMAD3. L'acétaldéhyde stimule également les cellules étoilées du foie pour produire des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires, favorisant le développement de la fibrose (Lee YP et al., 2013).

- Formation de radicaux libres

Le métabolisme de l'éthanol est fortement impliqué dans l'induction du stress oxydatif. La formation des espèces réactives oxygénées (ROS) suite au métabolisme de l'éthanol peut avoir lieu dans le cytosol, la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique. Le métabolisme de l'éthanol conduit à l'accumulation des ROS, principalement le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'anion super oxyde O_2^- , qui sont exacerbés par l'hypoxie, la translocation bactérienne et la libération de cytokines pro-inflammatoires. Étant donné leur courte demi-vie et leur réactivité élevée, ces radicaux se lient rapidement à l'éthanol ou aux atomes de fer pour former des métabolites réactifs tels que l'oxyde ferreux (FeO) ou le radical hydroxyéthyle (CH_3CHOH),

Chapitre 2 : Les maladies alcooliques de foie :

Le foie étant le principal site du métabolisme de l'alcool, cet organe est particulièrement sensible aux lésions induites par l'alcool. Ces lésions se regroupent sous le terme de « maladies alcooliques du foie » (ALD).

1. Mécanisme de l'inflammation induit par l'alcool :

Les maladies alcooliques du foie (MAF) résultent de l'hépatotoxicité directe de l'éthanol métabolisé en acétaldéhyde dans les hépatocytes (Aravinthan et al., 2013). Mais aussi, de l'augmentation de la perméabilité intestinale (Martínez-Esparza et al., 2015) qui permet aux bactéries et aux endotoxines de passer dans la circulation portale (Mutlu et al., 2012 ; Szapo, 2015).

L'abus d'alcool entraîne également des changements dans le microbiote intestinal, conduisant à des niveaux sériques élevés de lipopolysaccharide (LPS). Cette augmentation induit des actions inflammatoires dans les cellules de Kupffer via la voie du récepteur CD14-Toll-like 4 (TLR4) (**fig.5**). Le milieu inflammatoire résultant dans le foie alcoolique conduit alors à une infiltration de polynucléaires, une formation de ROS et des lésions hépatocellulaires (Altamrano et Bataller, 2011 ; Kirpich et McClain, 2012). Cela favorise une dysbiose intestinale, et active le système du complément et la production de cytokines pro-inflammatoires notamment le TNF- α par l'activation du facteur NF- κ B. En outre, il existe un effet synergique entre l'alcool et le LPS car l'alcool augmente la sensibilité des cellules de Kupffer au LPS en favorisant l'activation d'ERK1/2 (**fig.6**) (Mathurin et al., 2011).

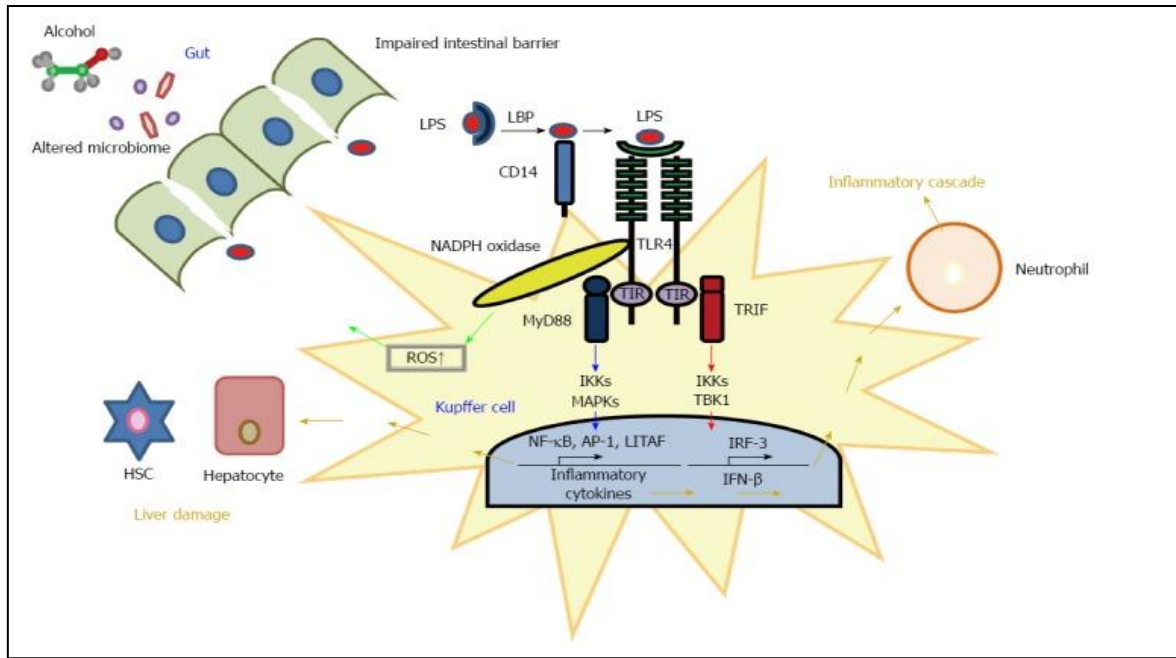


Figure 5: voie de signalisation LPS/TLR 4 (Ceccarelli et al., 2014)

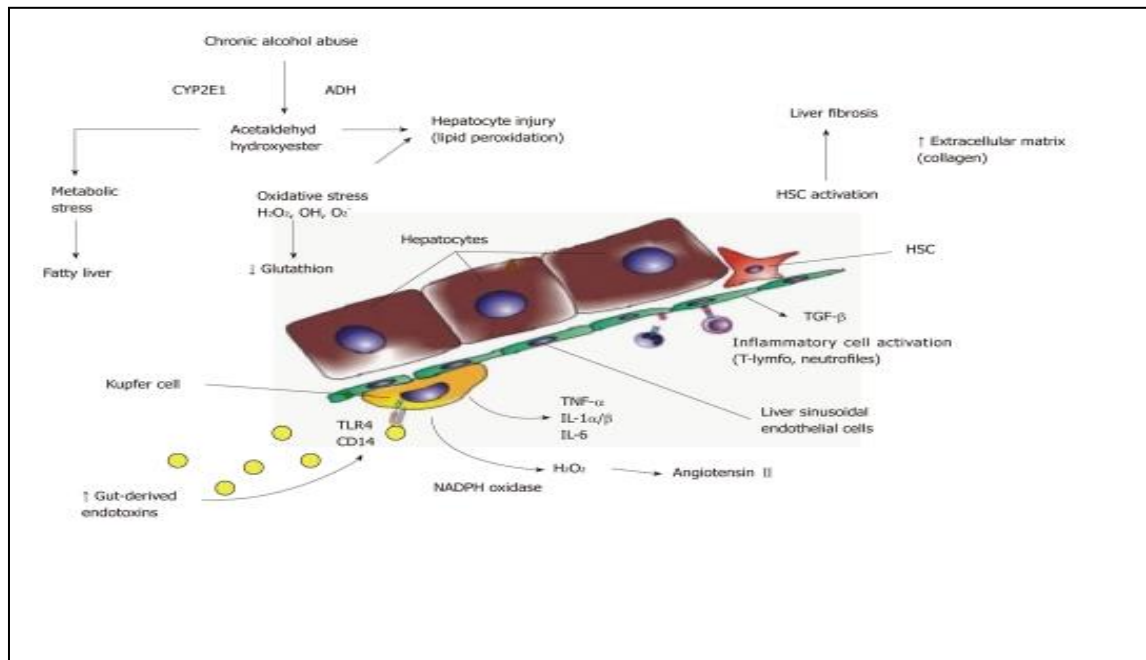


Figure 6: mécanismes inflammatoires dans les maladies alcooliques du foie (Bruha et al., 2012)

2. Lésions histologiques des maladies alcooliques du foie :

Les atteintes hépatiques liées à l'alcool regroupent un large spectre de lésions histologiques et comprennent un ensemble de désordres hépatiques allant de la simple accumulation de lipides dans le foie, connue sous le nom de stéatose, à une inflammation en présence ou non de fibrose désignée hépatite alcoolique, pouvant évoluer en cirrhose (**fig.7**) (Lanthier et Spahr, 2016).

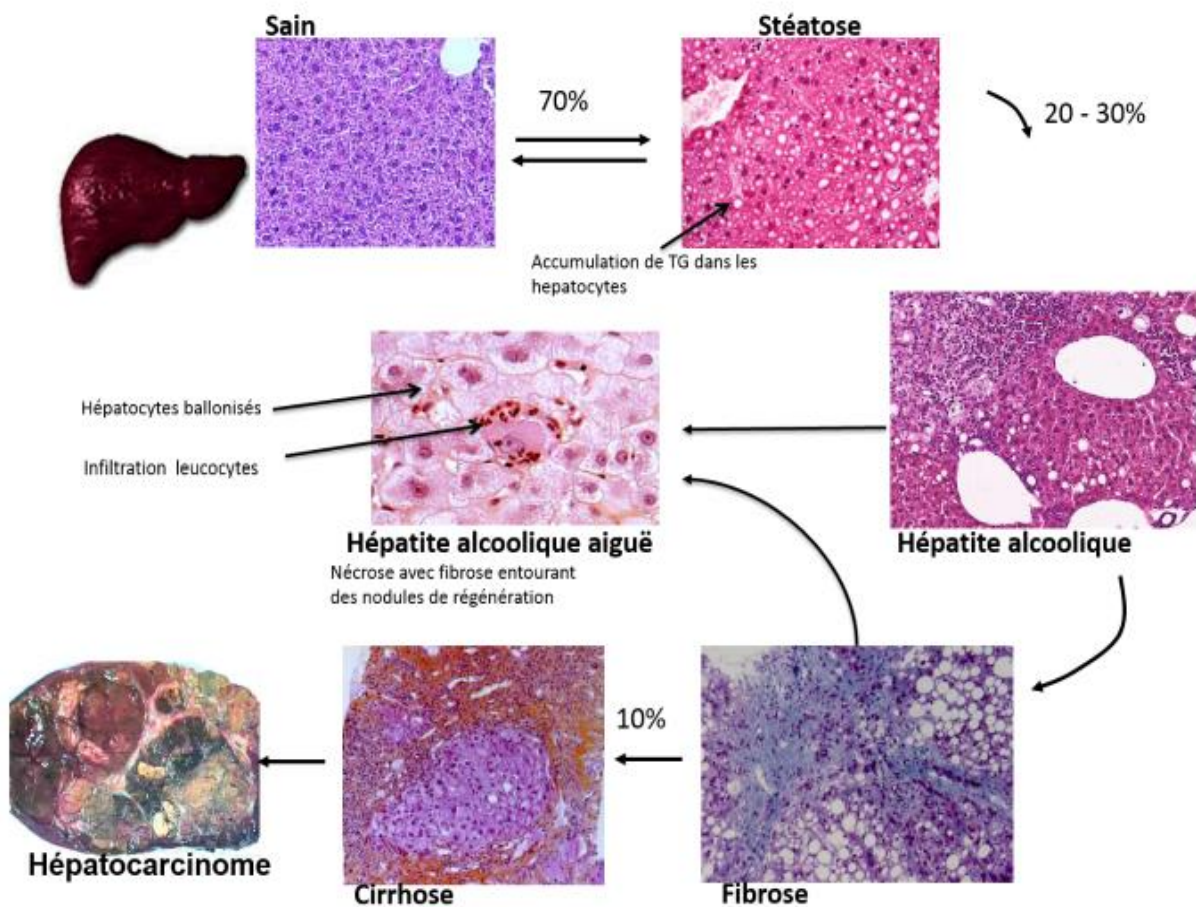


Figure 7: Histoire naturelle des maladies alcooliques du foie. Le spectre des lésions hépatiques des maladies alcooliques comprend la stéatose, l'hépatite, la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire

2.1. La stéatose :

La stéatose est une lésion histologique fréquemment retrouvée dans les biopsies humaines hépatiques. Elle est souvent due à une consommation excessive de boissons alcoolisées (Shasthry et al., 2017 ; Voican et al., 2016).

La stéatose résulte d'un déséquilibre de l'homéostasie lipidique hépatique associant un apport accru d'acides gras dans le foie et une diminution de leur utilisation (Clugston et al., 2014).

Au niveau hépatique, on peut observer également une oxydation anormale des acides gras dans les mitochondries endommagées et une détérioration du transport systémique d'acides gras via la sécrétion de protéines à très basse densité (VLDL) surtout en cas de malnutrition, d'action des toxines ou de prise de médicaments (Fabbrini et al., 2010).

2.2. Hépatite alcoolique :

L'hépatite alcoolique correspond à une forme histologique d'inflammation causée par la consommation chronique et excessive d'alcool (Louvet, 2017). La surproduction de médiateurs pro-inflammatoires qui en résulte, favorise la stéatogénèse et contribue à la progression vers l'hépatite en favorisant l'apoptose hépatocytaire (Miller et al., 2011).

La maladie se caractérise aussi, par la présence de corps de Mallory, d'un infiltrat de polynucléaires neutrophiles et d'une ballonnisation des hépatocytes (**fig.8**) (Hamid et Forrest, 2011).

La physiopathologie de l'hépatite alcoolique est sous-tendue par un processus inflammatoire dans lequel les cellules de Kupffer résides du foie, jouent un rôle majeur (**fig.9**) (Gao et al., 2011).

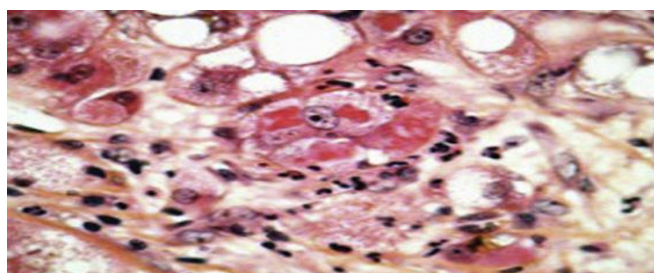


Figure 8: *Aspect histologique de l'hépatite alcoolique (Trabut et al., 2012)*

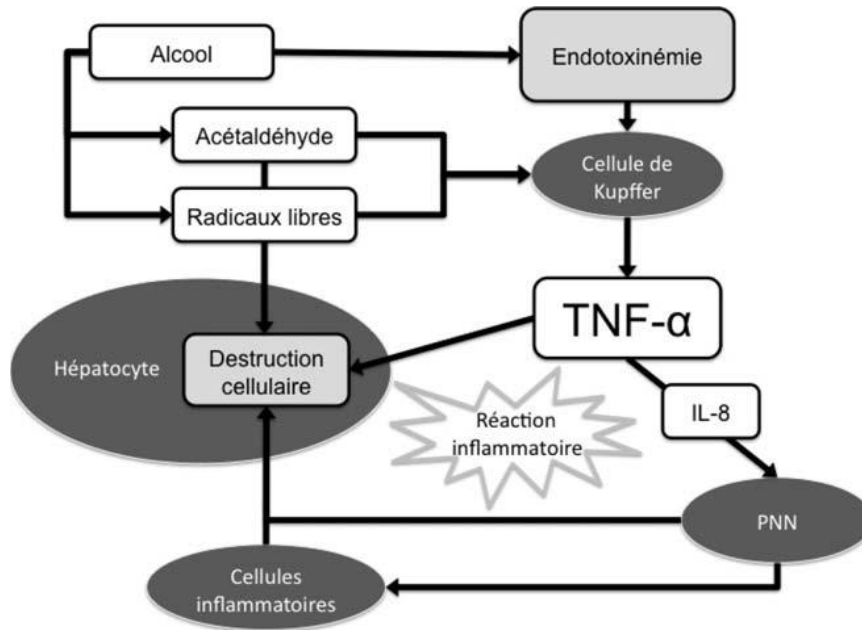


Figure 9: Physiopathologie de l'hépatite alcoolique (Dupont et al., 2011)

2.3. La fibrose :

La fibrose hépatique est définie par l'accumulation progressive d'une matrice extracellulaire de composition altérée dans le parenchyme hépatique en réponse à une agression chronique. La fibrose s'étend des zones lésées vers l'ensemble du lobule hépatique conduisant à une altération structurale et fonctionnelle. (Sergent et al., 2014)

L'alcool favorise la fibrose hépatique à travers l'inhibition de l'activité des cellules NK dans le foie et l'augmentation de la production d'IL-10 et de TGF- β par les macrophages et les cellules étoilées du foie. En outre, les cellules NK présentent une activité anti-fibrotique, elles produisent l'IFN- α , une cytokine induisant l'arrêt du cycle cellulaire et déclenchant l'apoptose des cellules étoilées activées ou sénescentes (Krizhanovsky et al., 2008) (**fig.10**).

La fibrose représente la principale complication des maladies hépatiques chroniques. Sa progression conduit à la cirrhose (El-Karaksy et al, 2014).

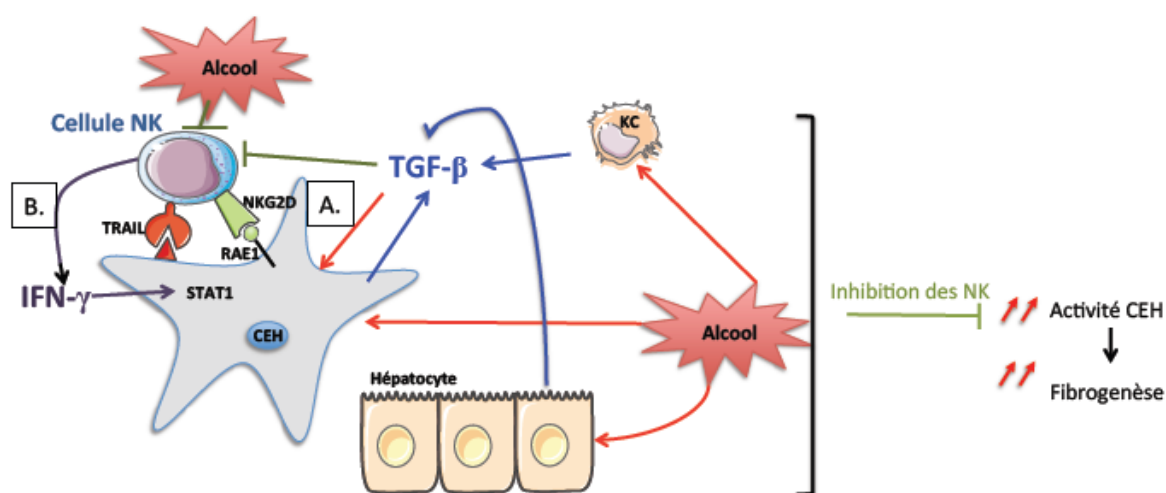


Figure 10 : *Modèle d'accélération de la fibrogenèse engendrée par l'alcool (Jeong, 2008)*

2.4. La cirrhose

La cirrhose est la voie finale des maladies inflammatoires du foie, elle s'accompagne d'une destruction totale de l'architecture du tissu hépatique et représente le principal facteur de risque du carcinome hépatocellulaire. La maladie peut conduire à une insuffisance hépatique chronique ce que nécessite une transplantation de foie en cas d'une mauvaise prise en charge (Dietrich et al., 2016).

La cirrhose se manifeste par l'apparition d'un tissu cicatriciel ou fibrose, composé principalement de faisceaux de collagène, et par le développement de nodules hépatocytaires de structure anormale. Ces anomalies architecturales sont associées à des zones inflammatoires, une obstruction de la circulation sanguine et biliaire et constituent les sites de développement du carcinome hépatocellulaire (Pham et al., 2017). Bien que les causes de la cirrhose hépatique soient multifactorielles, il existe des caractéristiques pathologiques communes à tous les cas de cirrhose du foie, y compris la dégénérescence et la nécrose des hépatocytes, et le remplacement du parenchyme hépatique par les tissus fibrotiques, les nodules régénératifs et la perte de fonction hépatique (Zhou, 2014).

Chapitre 3 : L'effet d'alcool sur le cerveau

Le cerveau est un organe particulièrement sensible aux effets délétères de l'alcool. Une consommation excessive et prolongée d'alcool est en effet responsable de nombreuses complications neurologiques (Seuvée-moreau et sentin, 2015) et de certaines anomalies structurelles et fonctionnelles du cerveau (Harper, 2009)

L'alcool, lorsqu'il est ingéré, est absorbé au niveau du duodénum puis distribué par la circulation sanguine peut être amené à traverser la barrière hémato-méningée. Lorsqu'il est consommé régulièrement ou en quantité importante sur de brèves périodes, induit, tout comme son métabolite, l'acétaldéhyde, des lésions directes sur le tissu cérébral. Du fait de sa lipophilie, il agit sur les phospholipides membranaires et modifie la plasticité des cellules cérébrales, ce qui entraîne des changements dans la circulation de neuromédiateurs, notamment l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (sédation) (vabret et al., 2016).

1. Le récepteur GABA :

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est un neurotransmetteur inhibiteur largement distribué dans tout le système nerveux central (SNC) (Khan et al., 2016 ; Obata, 2013). Il exerce ses effets biologiques par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs, dont les mieux caractérisés sont appelés récepteur GABA_A et GABA_B. Le premier est directement associé à un canal de chlore, alors que le second est indirectement couplé à un canal cationique (Bacon et Viennot, 1990) (**fig.11**).

Le récepteur GABA est impliqué dans le développement et l'organisation du SNC, l'apprentissage et la mémoire, l'anxiété et l'addiction. Les récepteurs GABA_A subissent une modulation allostérique par plusieurs médicaments, dont l'éthanol, les benzodiazépines (BZ), les barbituriques, les anesthésiques et les névrostoïdes endogènes. Les récepteurs GABA_A sont composés de cinq sous-unités, chacune ayant plusieurs isoformes (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π , ρ 1-3). La plupart des récepteurs se composent de deux sous-unités α , deux β et une γ . (Enoch et al., 2013).

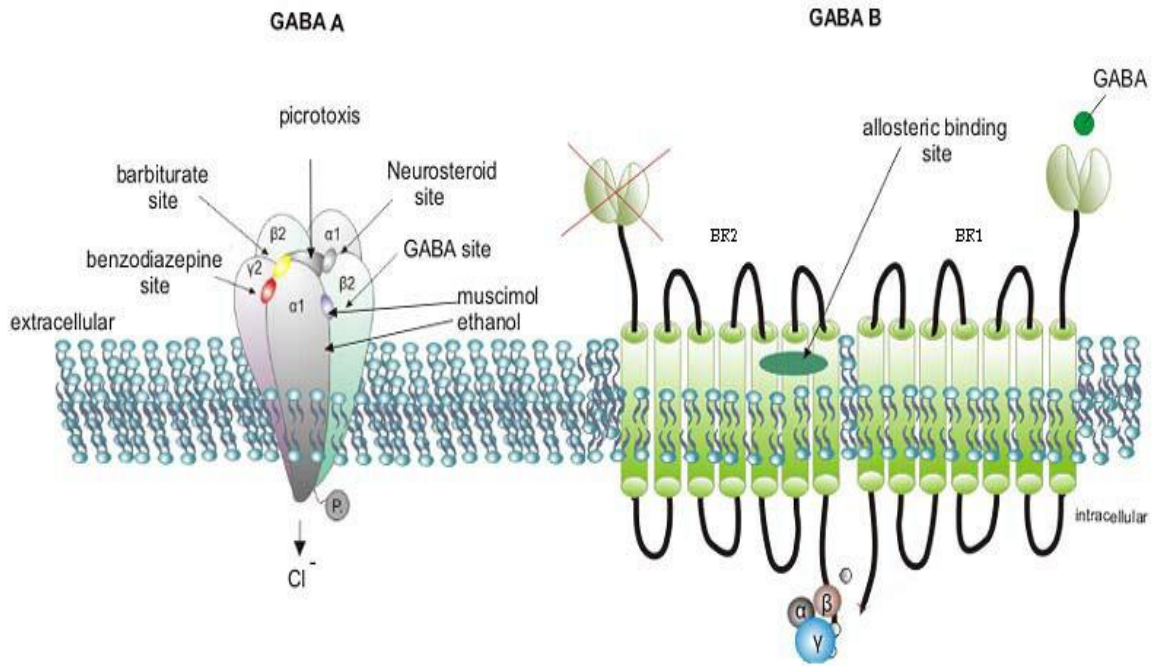


Figure 11: Une représentation schématique du $GABA_A$ et $GABA_B$ (Popova, 2014 ;Wieronska et al., 2011)

Le rôle du GABA dans la réactivité à l'alcool a été bien établi dans les modèles animaux, et des altérations liées au GABA ont été étudiées chez les humains souffrant de troubles de l'abus d'alcool (Silveri, 2014).

2. Alcool et le récepteur GABA :

L'alcool éthylique (éthanol) a beaucoup de cibles moléculaires dans le système nerveux (Linden et al., 2011). Au niveau post synaptique, l'alcool se fixe sur les récepteurs GABA au niveau d'une poche de liaison avec une affinité très faible il faut donc une forte dose d'alcool pour obtenir une réaction. L'alcool potentialise la réponse inhibitrice des récepteurs GABA (Vincent, 2007) (**fig.12**).

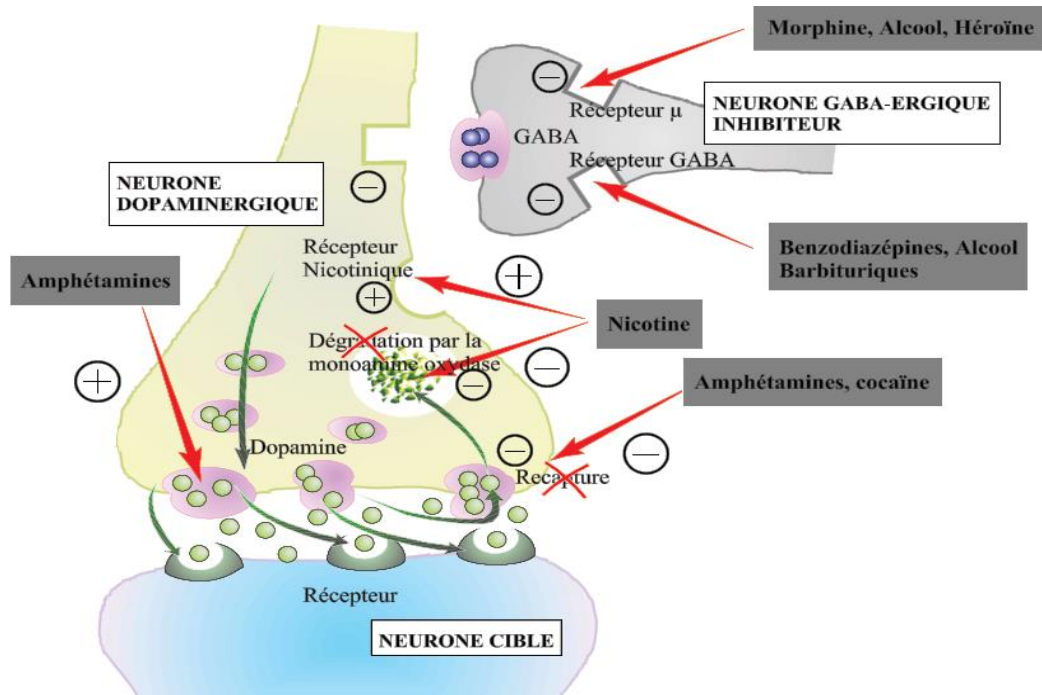


Figure 12: Interactions entre les récepteurs et les agonistes des neurotransmetteurs au niveau des synapses. (Paille et Malet, 2011)

L'éthanol agit comme un agoniste fonctionnel chez le récepteur GABA_A et augmente la libération de GABA pré-synaptique, avec une diminution associée de la fonction GABA_A après exposition chronique à l'éthanol dans certains dosages comportementaux (Bell et al., 2013).

L'activité GABA-ergique est également impliquée dans la médiation des effets de l'exposition chronique à l'alcool et devient modifiée avec le développement de la tolérance et de la dépendance à l'alcool et lors du retrait. L'administration des agonistes GABA augmente la consommation d'alcool et l'administration d'antagonistes GABA diminue la consommation d'alcool ; Mais tandis que l'exposition aiguë à l'alcool favorise l'activité GABA, les récepteurs GABA_A régulent négativement l'exposition chronique à l'éthanol, ce qui entraîne une diminution de l'efficacité de l'alcool. En outre, les agonistes GABA bloquent les symptômes comportementaux du retrait d'alcool, tandis que les antagonistes GABA les exacerbent (Irons et al., 2014).

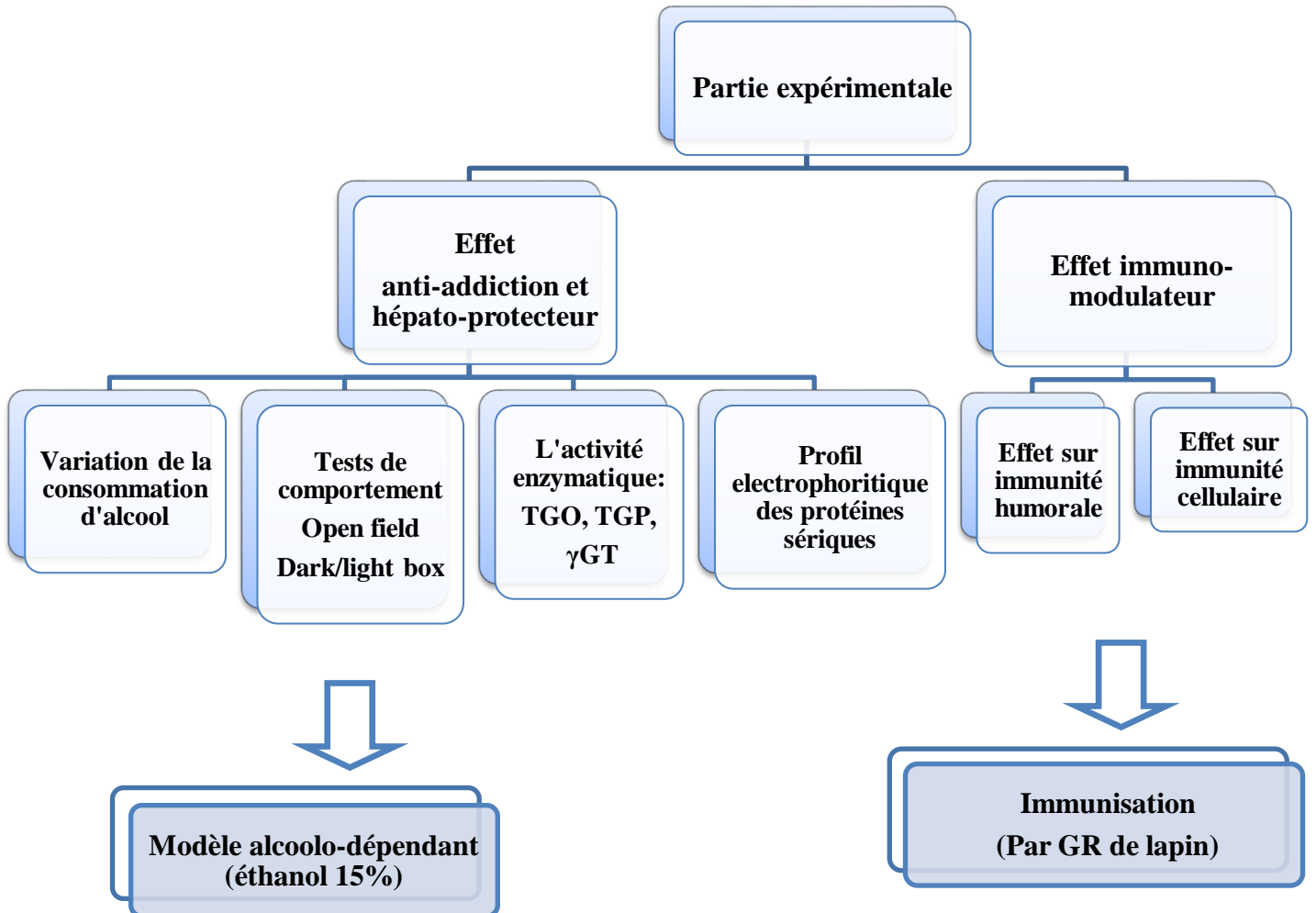
Partie
expérimentale

Partie expérimentale

III. Partie expérimentale :

1. Matériel et méthode :

La partie expérimentale est partagée en deux parties distinctes comme suit :



Partie expérimentale

1.1. Matériel biologique :

L'étude est effectuée sur un groupe de rats femelle Wistar albinos provenant de l'animalerie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université des Frères Mentouri- Constantine. Les rattes sont âgées de 45 jours, de poids corporel moyen de 76 g.

Une fois reçues les rattes sont logées dans des cages en plastique à une température ambiante de (25°C) avec un régime alimentaire standard. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture.

1.2. Le baclofène :

Le baclofène ou l'acide 4-amino-3-p-chlorophényl butyrique est un agoniste des récepteurs centraux et périphériques GABA_B commercialisé sous forme racémique (**fig.13**) (Thill et al., 2016).

Nous avons utilisé dans nos expérimentations la forme commercialisée BACRO 10 mg du laboratoire : INDUSTRIA FARMACEUTICA NOVA ARGENTIA SPA-VIA.

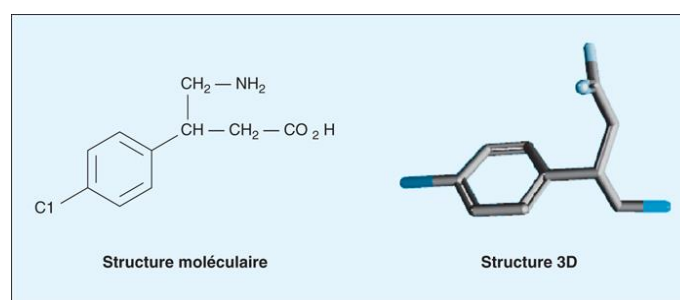


Figure 13 : Molécule du baclofène (Thill et al., 2016).

1.3. Analogue du baclofène :

C'est un analogue synthétique du baclofène, mimétique du récepteur GABA.

2. Effet des deux analogues du récepteur GABA sur l'alcool-dépendance :

2.1. Développement du modèle d'alcool-dépendant :

L'étude a été réalisée sur 20 ratte femelles divisées en 5 lots :

- **Les 4 premiers lots :** Durant les 3 premiers jours de traitement et afin de permettre aux ratte de déguster l'alcool, le biberon d'eau est remplacé la nuit par un biberon d'éthanol 10%. Ensuite et pour le reste de la période du traitement chaque cage sera munies de 2 biberons un rempli d'eau et l'autre d'éthanol 15%.

Les animaux auront donc accès libres à l'eau et à l'éthanol durant les 24 heures.

Le lot control : La cage est munie d'un seul biberon contenant l'eau

Les quantités d'eau et d'éthanol consommées sont mesurées chaque 24 h et exprimées en g d'éthanol par kilogramme de rat (g/kg). L'étude s'est étalée sur une période de 8 semaines et les ratte ont été traitées par l'éthanol 3 jours successifs par semaine.

2.2. Effet des deux analogues du récepteur GABA sur la dépendance alcoolique :

Après huit semaines, les ratte sont redistribuées et organisées en 6 lots comme suit :

- Lot 1: la cage est munie d'un seul biberon contenant l'eau.
- Lot 2: la cage est munie de deux biberons un contenant l'eau et l'autre l'éthanol 15%.
- Lot 3: la cage est munie d'un seul biberon contenant l'eau. Les animaux de ce lot reçoivent une dose de 1,5 mg/kg de baclofène par voie orale.
- Lot 4 : la cage est munie d'un seul biberon contenant l'eau. Les animaux de ce lot reçoivent une dose de 1,5 mg/kg d'analogue par voie orale.
- Lot 5 : la cage est munie deux biberons un contenant l'eau et l'autre l'éthanol 15%. Les animaux de ce lot reçoivent une dose de 1,5 mg/kg de baclofène par voie orale.
- Lot 6 : la cage est munie deux biberons un contenant l'eau et l'autre l'éthanol 15%. Les animaux de ce lot reçoivent une dose de 1,5 mg/kg d'analogue par voie orale.

Après une semaine, la dose du baclofène et de l'analogue est augmentée à 3 mg/kg par jour.

Partie expérimentale

Les doses sont calculées en référence à la dose humaine du baclofène selon l'équation de Nair et Jacob, 2016 :

$$\text{Dose animale (mg/kg)} = \text{dose humaine (mg/kg)} * \text{Km}$$

Km du rat =6

La dose humaine de départ du baclofène = 15mg/jours.

2.3.Effet des deux analogues du récepteur GABA sur le comportement des rattes :

2.3.1. Le test de champ ouvert (Open Field) :

– Principe :

Le dispositif est une plateforme en plexiglas (70cm ×70 cm × 40 cm) divisée en deux zones. Une zone centrale de 35 cm² et une zone périphérique. Chaque rat est placé individuellement au centre du plancher et laissé 5 min d'exploitation. Un animal considéré comme anxieux aura tendance à préférer les zones périphériques (**fig.14**) (saenz et al., 2006).



Figure 14: image photographiée qui illustre le dispositif du test de comportement

(Open Field).

Le temps que l'animal passe dans la périphérie et le centre est chronométré.

2.3.2. Test light /dark box:

Le test repose sur la nature des rats qui préfèrent les endroits obscurs. Cette conduite éthologique est utilisée pour estimer le degré d'anxiété chez l'animale. Le test se fait sur le même dispositif que le test précédent (test de champs ouvert) après avoir divisé le plancher en deux compartiments un obscur éclairé par une lampe rouge faible et l'autre a été laissé transparent (exposé à la lumière du jour) une ouverture jouant le rôle de porte a été créé entre

Partie expérimentale

les deux compartiments pour permettre à l'animale de se déplacer librement entre les deux compartiments

Au début du test les rattes sont placées dans la zone claire et l'activité comportementale a été enregistrée pendant 5 min (**fig.15**) (Arrant et al., 2013).

Le temps passé dans les deux chambres est chronométré.



Figure 15: image photographiée qui illustre le dispositif du test d'obscurité.

2.4. Prélèvement:

Un prélèvement sanguin oculaire est réalisé après 4 semaines de traitement et le plasma est conservé à 20°C.

2.5. Analyse qualitative des protéines sériques :

– Principe :

L'électrophorèse des protéines sériques a été réalisé à l'aide de d'automate CEBIUtilisant le kit MINICAP PROTEIN(E) 6 qui permet la séparation dans un milieu basique (pH 9,9) des protéines du sérum par électrophorèse capillaire dans le système automatique MINICAP.

Ce dernier utilisé le principe de l'électrophorèse capillaire en solution libre. Il permet la séparation de molécules chargées en fonction de leur mobilité électrophorétique propre dans un tampon de pH donné, selon le pH de l'électrolyte et d'un flux électro-osmotique plus ou moins important.

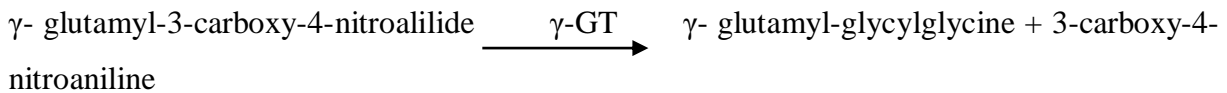
Partie expérimentale

2.6. Effet des différents traitements sur les marqueurs des lésions hépatiques :

2.6.1. Dosage de l'activité glutamyltransferase : (γ -GT)

– Principe :

Gamma-glutamyltransferase γ -GT catalyse le transfert du groupement γ -glutamyl du γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide en glycylglycine en libérant 3-carboxy-4-nitroalanine. La concentration catalytique est déterminée par le taux de 3-carboxy-4-nitroaniline formé.



– Méthode :

L'activité enzymatique de γ -GT a été mesurée en utilisant le kit BioSystems GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE.

Le dosage s'effectue dans une cuve du spectrophotomètre, en mélangeant 1 ml du mélange réactionnel avec 100 μ l du plasma.

La lecture des absorbances est effectuée chaque minute pendant 3 min à une longueur d'onde 410 nm.

L'activité de l'enzyme est calculée selon la formule:

$$\Delta A/\text{min} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_s} = U/L$$

ϵ : le coefficient d'extinction moléculaire du NaDH à 410 nm est égale 6300.

l : le trajet optique égal à 1 cm.

V_t : le volume réactionnel total est 1,1 à 25°C.

V_s : le volume d'échantillon de 100 μ l à 25°C.

$\Delta A/\text{min}$: L'accroissement moyen est calculé suite a cette formule:

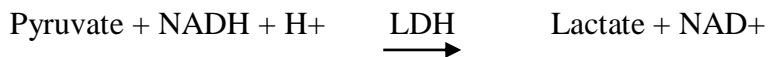
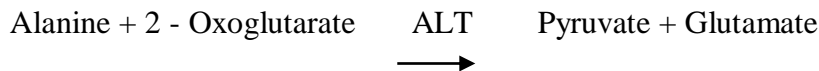
$$\Delta A/\text{min} = \Delta D_o * 3333 \text{ (U/L)}$$

2.6.2. Dosage de l'activité de l'alanine-amino transférase (ALT/ TGP) :

– Principe :

L'alanine-aminotransférase (ALT ou TGP) est une enzyme qui catalyse le transfert du groupement amine de l'alanine au 2-oxoglutarate, en formant le pyruvate et le glutamate. La concentration catalytique est déterminée en utilisant la réaction couplée de la lactate-déshydrogénase (LDH), à partir de la vitesse de disparition du NADH, mesuré à 340 nm.

Partie expérimentale



– Méthode :

L'activité enzymatique de TGP a été mesurée en utilisant le kit BioSystems ALANINE AMINOTRANSFERASE. Le mélange réactionnel est formé de deux réactifs le premier est une solution de Tris (150 mmol/L), L-alanine (750 mmol/L) et lactate-déshydrogénase (> 1350 U/L). Le deuxième est formé de NADH (1,9 mmol/L), 2-oxoglutarate (75 mmol/L), Hydroxyde de sodium (148 mmol/L) et sodium azide (9,5 g/L).

La méthode de dosage consiste à mélanger dans la cuve du spectrophotomètre 1 ml du mélange réactionnel avec 100 µl de plasma.

La lecture des absorbances est effectuée chaque minute pendant 3 min à une longueur d'onde 340 nm.

L'activité enzymatique du TGP de l'échantillon est calculée selon la formule suivante:

$$\Delta A/\text{min} \times \frac{Vt \times 10^6}{\epsilon \times l \times Vs} = \text{U/L}$$

ϵ : le coefficient d'extinction moléculaire du NaDH à 340 nm est égale 6300.

l : le trajet optique égal à 1 cm.

Vt : le volume réactionnel total est 1,100 à 30°C.

Vs : le volume d'échantillon de 100µl à 30°C.

$\Delta A/\text{min}$: L'accroissement moyen est calculé suite a cette formule:

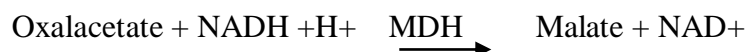
$$\Delta A/\text{min} = \Delta Do * 3333 \text{ (U/L)}$$

2.6.3. Dosage de l'activité de l'aspartate-aminotransférase (AST/ TGO)

– Principe :

L'alanine-aminotransférase (AST ou TGO) est une enzyme qui catalyse le transfert du groupement amino de l'aspartate au 2-oxoglutarate, en formant l'oxaloacétate et le glutamate. La concentration catalytique est déterminée, en utilisant la réaction couplée de la malate-déshydrogénase (MDH), à partir de la vitesse de disparition du NADH, mesuré à 340 nm

Partie expérimentale



– Méthode :

L'activité enzymatique de TGO a été mesurée en utilisant le kit BioSystems ASPARTATE AMINOTRANSFERASE. Le mélange réactionnel est formé de deux réactifs, une solution de Tris (121 mmol/L), L-aspartate (362 mmol/L), malate-déshydrogénase (> 460 U/L) et lactate-déshydrogénase (> 660 U/L) et une solution formée de NADH (1,9 mmol/L), 2-oxoglutarate (75 mmol/L), Hydroxyde de sodium (148 mmol/L) et sodium azide (9,5 g/L).

Le dosage s'effectue dans une cuve du spectrophotomètre, en mélangeant 1 ml du mélange réactionnel avec 100 µl du plasma.

La lecture des absorbances est effectuée chaque minute pendant 3 min à une longueur d'onde 340 nm.

L'activité de l'enzyme est calculée selon la formule:

$$\Delta A/\text{min} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_s} = \text{U/L}$$

ϵ : le coefficient d'extinction moléculaire du NaDH à 340 nm est égale 6300.

l : le trajet optique égal à 1 cm.

V_t : le volume réactionnel total est 1,1 à 30°C.

V_s : le volume d'échantillon de 100 µl à 30°C.

$\Delta A/\text{min}$: L'accroissement moyen est calculé suite a cette formule:

$$\Delta A/\text{min} = \Delta Do * 3333 \text{ (U/L)}$$

3. Effet immuno-modulateur des deux analogues du récepteur GABA :

Afin d'étudier l'effet du baclofène et son analogue sur la réponse immunitaire humorale et cellulaire nous avons réalisé le protocole suivant :

Les rattes sont divisées en 6 lots et traités comme suit :

- **Lot 1**: reçoit une injection intra péritonéale de NaCl (0.09%)

Partie expérimentale

- **Lot 2 :** un lot contrôle qui reçoit une injection intra péritonéale de 0.1 ml globules rouge (0.1%) de lapin, puis une deuxième injection dans la patte droite après 7 jours, suivie d'une autre dans la patte gauche (0.1ml) après 15 jours.
- **Lot 3:** reçoit chaque jour une dose de 3 mg/kg du baclofène par voie orale (gavage).
- **Lot 4 :** reçoit chaque jour une injection intra péritonéale de 3 mg/kg de l'analogue.
- **Lot 5:** reçoit une injection intra péritonéale de globule rouge (0.1 ml) de lapin puis une deuxième injection dans la patte droite après 7 jours, suivie d'une autre dans la patte gauche (0.1ml) après 15 jours. En même temps les rattes sont traitées avec 3mg/kg du baclofène par voie orale.
- **Lot 6:** reçoit une injection intra péritonéale de globule rouge (0.1 ml) de lapin puis une deuxième injection dans la patte droite après 7 jours, suivie d'une autre dans la patte gauche (0.1ml) après 15 jours. En même temps les rattes sont traitées avec 3 mg/kg de l'analogue administré par voie intra péritonéale.

3.1. Effet sur les taux d'anticorps agglutinants :

Des dilutions sériales ont été effectuées pour chaque sérum 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,062%. Ensuite 10 µl de chaque échantillon ont été mélangé avec 5 µl de globules rouges de lapin.

Les taux d'anticorps agglutinants correspondent à la plus grande dilution dans laquelle la réaction d'agglutination est visible (haque et al, 2013).

3.2. Effet sur l'immunité cellulaire :

L'effet de deux composées (baclofène et son analogue) sur la réponse cellulaire est évalué par une réaction d'hypersensibilité retardée. La réaction est mesurée par la variation de l'épaisseur du pied après 24 heures de l'injection des globules rouges au niveau du pied (haque et al, 2013).

4. Etude statistique :

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel «SPSS». Les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne plus ou moins l'écart type.

La comparaison de moyennes a été réalisée par le test « t de Student » dont le seuil de signification est $p \leq 0,05$.

Résultats

IV. Résultats :

1. Effet des deux analogues du récepteur GABA sur la dépendance alcoolique :

1.1. Développement du modèle alcoolo-dépendant :

Les résultats (**fig.16**) montrent que la consommation d'alcool augmente progressivement à partir de la 3^{ème} semaine pour atteindre un taux de $36,53 \pm 6,38$ g/kg dans la 8^{ème} semaine. On note une diminution de la consommation de l'alcool dans la 3^{ème} semaine comparativement à la 2^{ème}, elle est due au changement de la concentration de l'alcool.

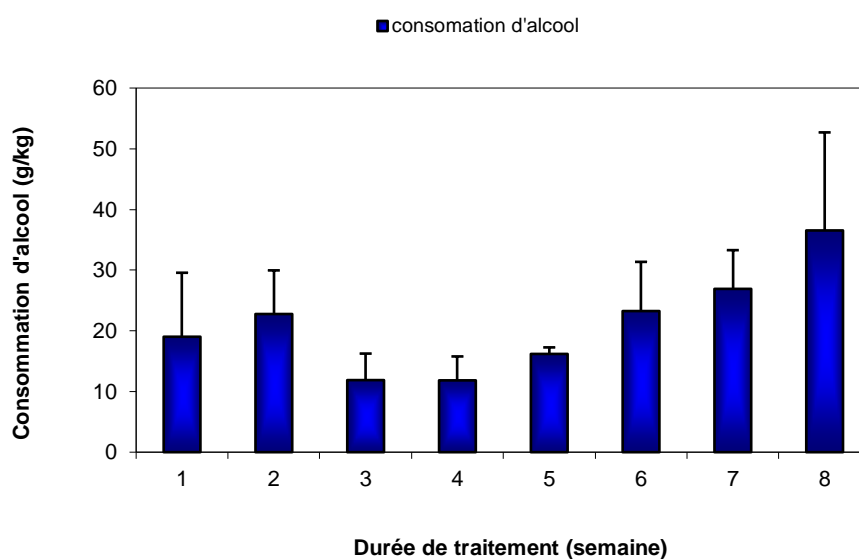


Figure16 : Le taux d'alcool consommés par les rattes exprimé en (g/kg).

1.2. Effet des deux analogues du récepteur GABA sur la consommation d'alcool :

Les résultats obtenus indiquent que la consommation d'alcool chez les rattes traitées par l'éthanol est maintenue stable durant les quatre semaines du traitement.

Chez les rattes alcooliques on remarque que le baclofène a diminué la consommation de l'alcool de manière significative durant les quatre semaines.

Cependant, l'analogue du baclofène entraîne une diminution de la consommation d'alcool uniquement au cours de la première semaine (**fig.17**).

Résultats

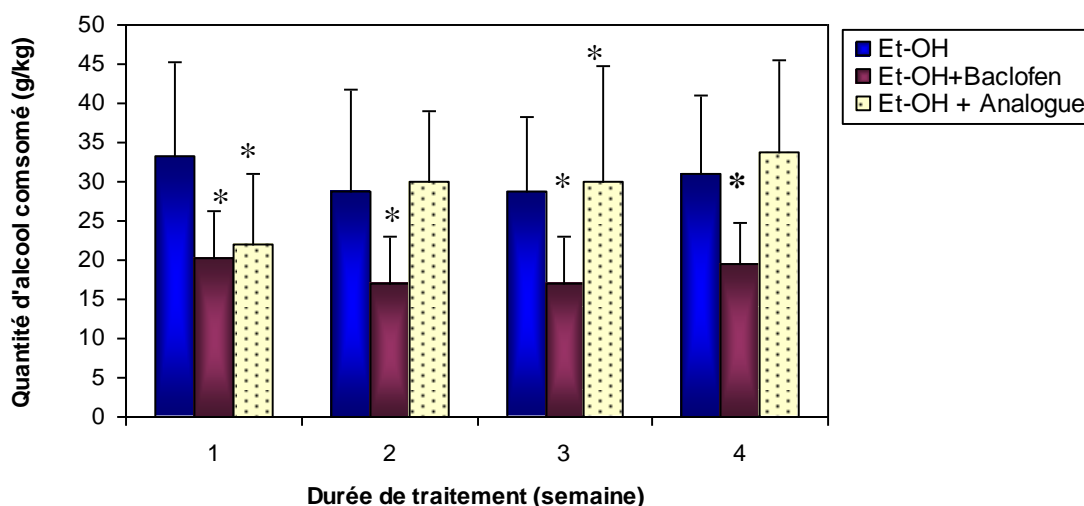


Figure 17 : Variation de la consommation d'alcool (exprimée en g/kg) après traitement par le baclofène et son analogue (*significatif comparativement au groupe traité par l'éthanol $p \leq 0.05$).

2. Effet des deux analogues du récepteur GABA sur le comportement des animaux :

2.1. Test de champ ouvert (Open Field) :

Les résultats montrent (**fig.18 et 19**) que le temps passé dans la périphérie est proportionnellement similaire chez tous les groupes traités comparativement au contrôle. Cependant, le temps passé dans le centre présente une grande variation où les rattes traitées par le baclofène et son analogue ont passé plus de temps dans la zone centrale.

L'effet du baclofène est significativement plus important comparativement au contrôle ($p=0.0372$) et au groupe traité par l'éthanol ($p=0.030$).

Chez les rattes alcooliques le traitement avec le baclofène ou son analogue augmente le temps passé dans la zone centrale. L'effet de l'analogue semble être plus marqué ($p=0.035$).

Résultats

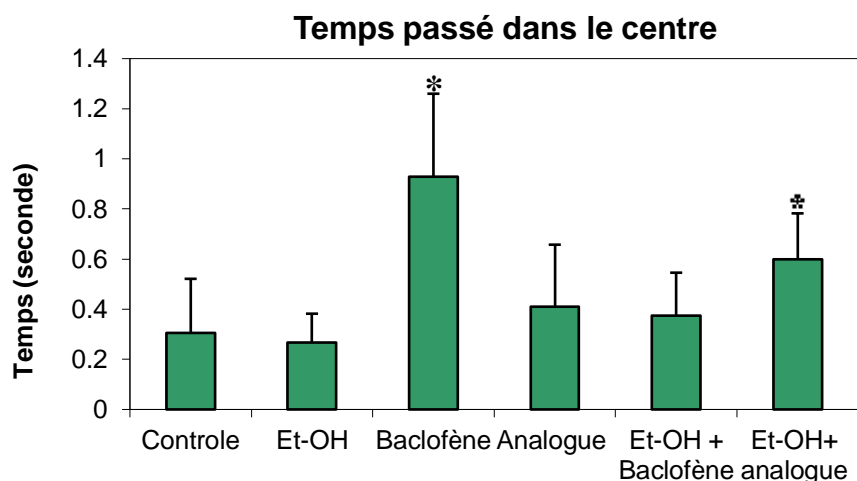


Figure 18: Effet du baclofène et son analogue sur le temps (s) passé dans la zone centrale au cours du test de champ ouvert (* significative $p \leq 0.05$).

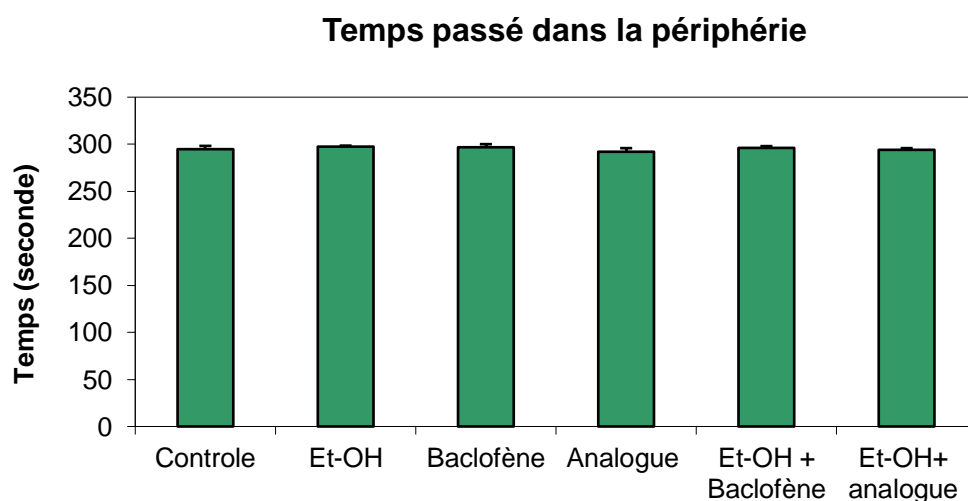


Figure 19: Effet du baclofène et son analogue sur le temps (s) passé dans la zone périphérique au cours le test de champ ouvert.

2.2. Test light dark box :

Nos résultats révèlent que le baclofène administré aux rattes saines ou alcooliques augmente le temps passé dans la zone de lumière. Néanmoins ce traitement n'a pas d'influence sur le temps passé au cours du premier épisode que ce soit en lumière ou en obscurité.

Résultats

D'autre part, l'analogue du baclofène n'a pas d'effet sur le temps total que les ratte passent entre les compartiments noirs et clair. Il augmente par contre le temps du premier épisode dans la lumière chez les ratte saine (fig.20 et 21).

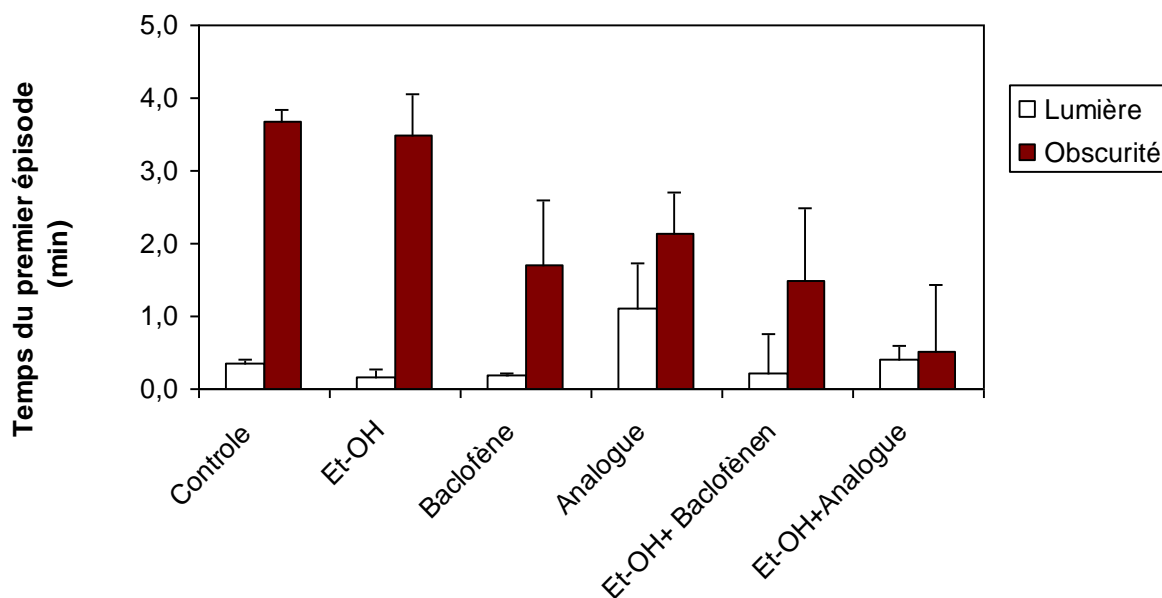


Figure 20: Effet du baclofène et son analogue sur le temps du premier épisode (min) passé dans la lumière et l'obscurité au cours de test.

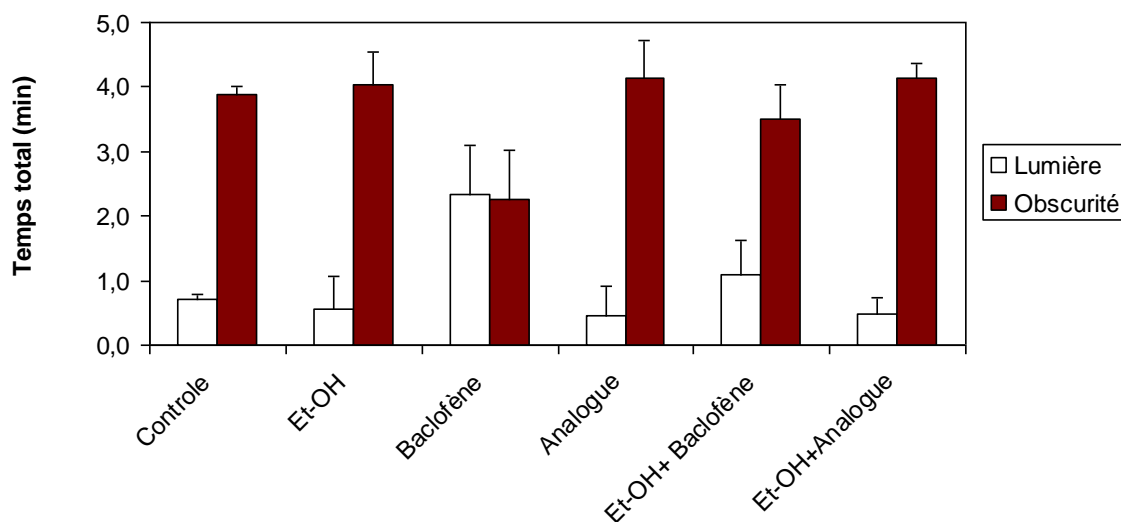


Figure 21: Effet du baclofène et son analogue sur le temps total (min) passé dans la lumière et l'obscurité au cours du test light dark box.

Résultats

3. Effet des deux analogues du récepteur GABA sur les marqueurs de lésions hépatiques :

3.1. Effet sur l'activité de l'enzyme γ GT:

Les résultats (**fig. 22**) montrent que le traitement avec l'éthanol, le baclofène ou son analogue entraînent une augmentation significative ($p= 0,01, 0,0003$ et $0,02$ respectivement) de l'activité de l'enzyme gamma GT comparativement au contrôle.

Cependant, le traitement des ratte par le baclofène seul augmente l'activité de l'enzyme gamma GT alors que l'administration de l'analogue seul diminue l'activité de cette enzyme de manière très significative ($p=0.01$) comparativement aux ratte traitées par l'éthanol.

Chez les ratte alcoolique on note que le baclofène diminue de manière non significative l'activité de l'enzyme gamma GT ($p=0.194$) alors que l'analogue l'augmente ($p=0.91$).

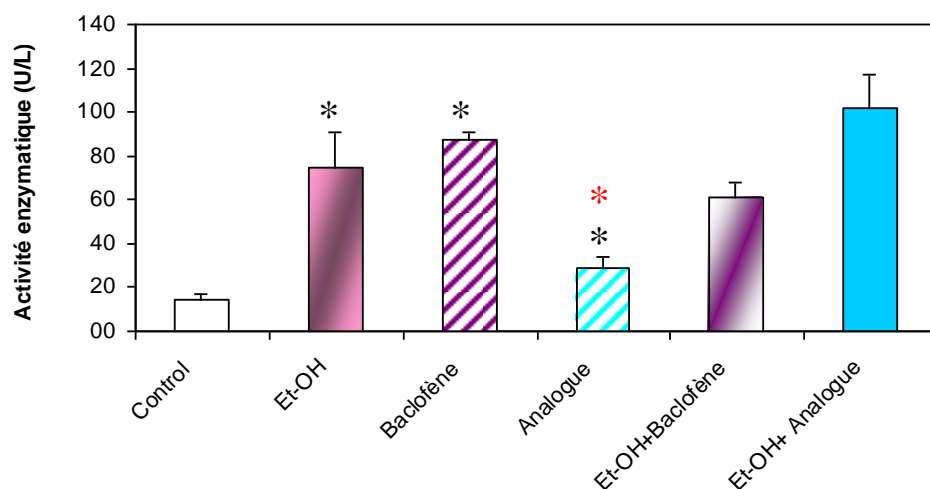


Figure 22: Effet du baclofène et son analogue sur l'activité de l'enzyme **gamma GT** ($n \geq 3$).

(* significative comparativement au contrôle *comparativement au groupe traité par éthanol $p \leq 0.05$)

Résultats

Tableau 1: *Effet du baclofène et son analogue sur l'activité de l'enzyme gamma GT : comparaison par le test t de student (valeurs p, seuil de signification $\leq 0,05$)*

	éthanol	baclofène	analogue	Baclofène+ éthanol	Analogue+ éthanol
Contrôle	0.01	0.0003	0.02	0.002	0.006
Ethanol		0.113	0.012	0.194	0.091
Baclofène			0.0008	0.01	0.139
Ethanol+baclofène					0.03

3.2. L'effet sur l'activité du l'enzyme aspartate-aminotransférase (AST/TGO) :

La (**fig.23**) montre l'effet des différents traitements sur l'activité de l'enzyme TGO. Les résultats signalent que le traitement par l'éthanol, le baclofène et son analogue emporte une augmentation significative ($p=0.013$, $p=0.016$, $p=0.032$ respectivement) de l'activité enzymatique comparativement au contrôle.

Chez les rattes présentant une dépendance a l'alcool, le traitement par le baclofène et son analogue entraine une diminution non significative ($p=0.327$ et $p=0.085$ respectivement) de l'activité de l'enzyme TGO comparativement au groupe traité par éthanol.

Tableau 2: *Effet du baclofène et son analogue sur l'activité de l'enzyme TGO: comparaison par le test t de student (valeurs p, seuil de signification $\leq 0,05$)*

	éthanol	analogue	baclofène	Baclofène+ éthanol	Analogue+ éthanol
Contrôle	0.013	0.032	0.016	0.327	0.001
Ethanol		0.018	0.038	0.327	0.085
Analogue			0.287	0.169	0.029
Baclofène				0.327	0.017
Analogue+éthanol				0.206	

Résultats

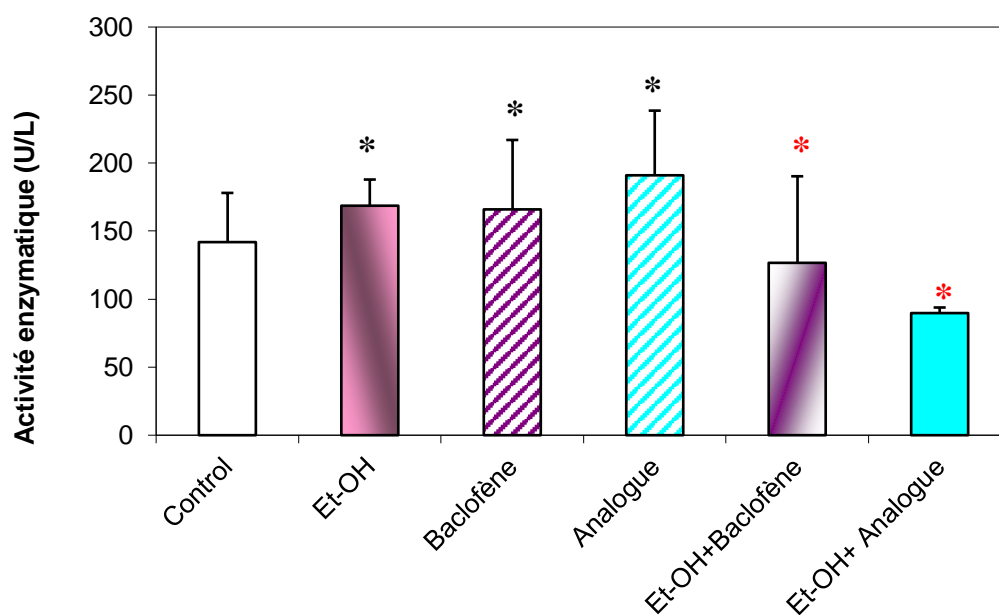


Figure 23 : Effet du baclofène et son analogue sur l'activité de l'enzyme TGO (n≥3).

(* significative comparativement au contrôle *comparativement au groupe traité par éthanol
 $p \leq 0.05$)

3.3. L'effet sur l'activité du l'enzyme alanine-aminotransférase (TGP/ALT) :

Les résultats indiquent que les différents traitements ; éthanol, baclofène et son analogue entraînent une augmentation de l'activité enzymatique de l'enzyme TGP comparativement au contrôle.

Le traitement avec baclofène seul augmente l'activité enzymatique hautement significative ($p=0.001$) comparativement au groupe traité par l'éthanol. L'analogue par contre, la diminue d'une manière non significative ($p=0.119$)

Chez les rattes alcooliques le baclofène entraîne une augmentation non significative de l'activité de l'enzyme TGP. Tandis que son analogue la diminue (**Figure 24**).

Résultats

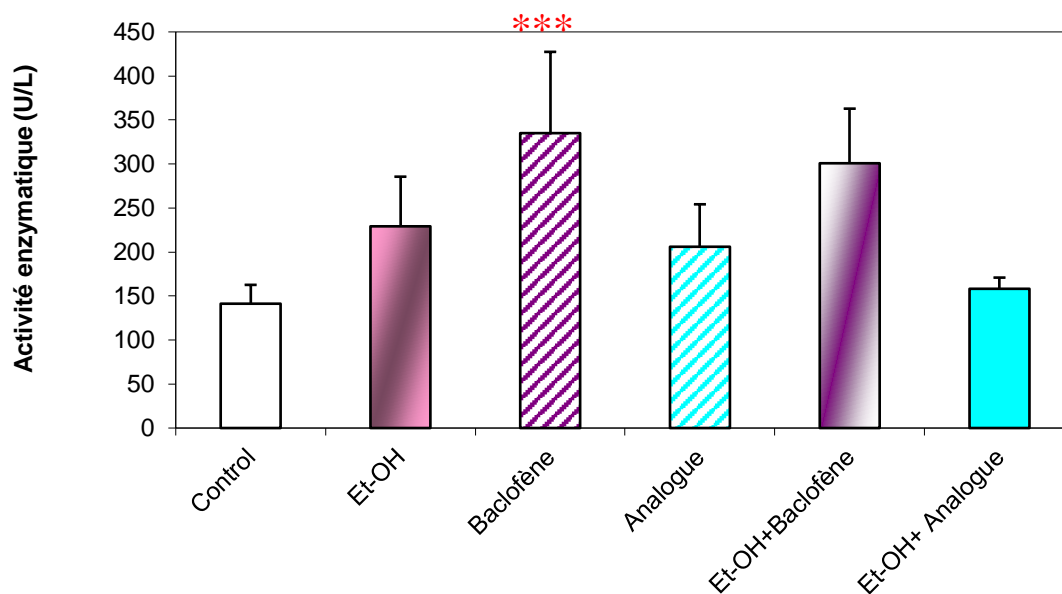


Figure 24 : Effet du baclofène et son analogue sur l'activité de l'enzyme *TGP* ($n \geq 3$).

(*** hautement significative comparativement au groupe traité par éthanol $p \leq 0.05$)

Tableau 3: Effet du baclofène et son analogue sur l'activité de l'enzyme *TGO*: comparaison par le test *t* de student (valeurs *p*, seuil de signification $\leq 0,05$)

	éthanol	analogue	baclofène	Analogue+ éthanol	Baclofène+ éthanol
Contrôle	0.192	0.137	0.010	0.040	0.016
Ethanol		0.245	0.001	0.119	0.126
Analogue			0.005	0.062	0.050
Baclofène				0.008	0.301
Analogue+éthanol					0.012

Résultats

3. Analyse qualitative des protéines sériques :

L'électrophorèse sépare les composants protéiques du sérum en 6 fractions (**fig.25**):

- Albumine
- Alpha 1 globuline
- Alpha2 globuline
- Beta 1 globuline
- Beta 2 globuline
- Gamma globuline

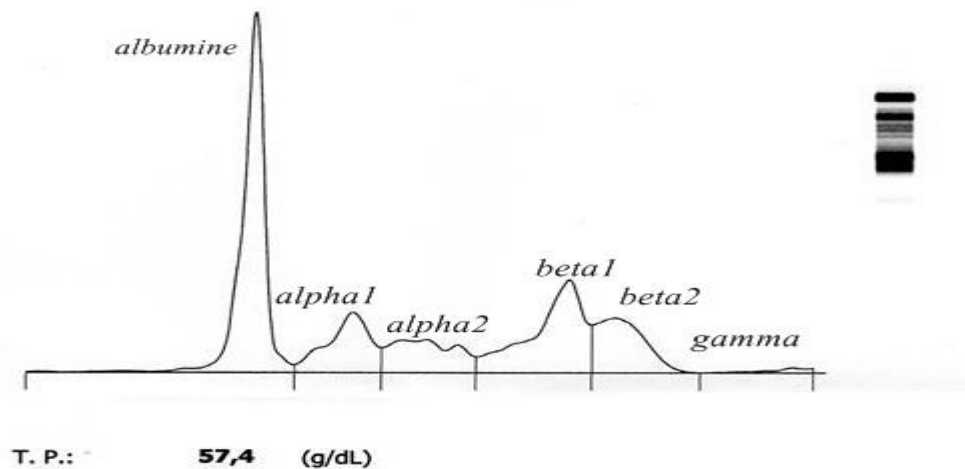


Figure 25: *Electrophérogramme des protéines sériques: exemple d'un de nos échantillon (groupe contrôle)*

3.1. Taux des protéines totales :

Nos résultats (**fig.26**) montrent que les traitements des rattes par l'éthanol, le baclofène ou son analogue n'ont pas d'effet sur les taux de protéines sériques. Néanmoins une augmentation est observée chez rattes saines traitées par l'analogue.

Résultats

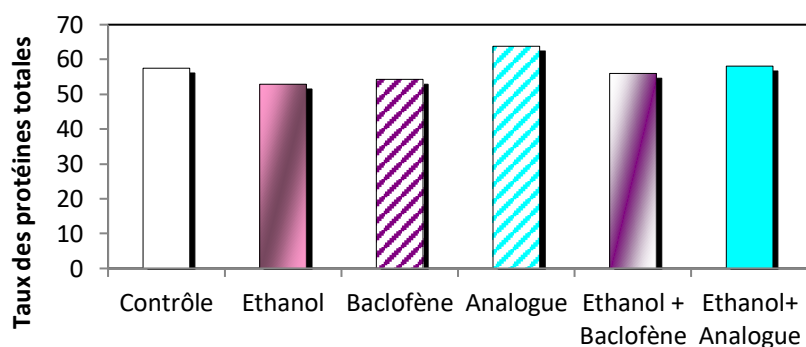


Figure 26: Effet du baclofène et son analogue sur le taux des protéines totales sériques exprimé en (g/dl).

3.2. Taux d'albumine :

La figure (fig.27) montre l'effet du traitement sur les taux d'albumine, on observe des taux très réduit d'albumine chez les rattes alcooliques. L'administration du baclofène ou de son analogue restitue les taux de la protéine dans le sérum de ces rattes.

Chez les rattes saines les deux analogues du récepteur GABA n'ont pas d'effet sur les taux de l'albumine.

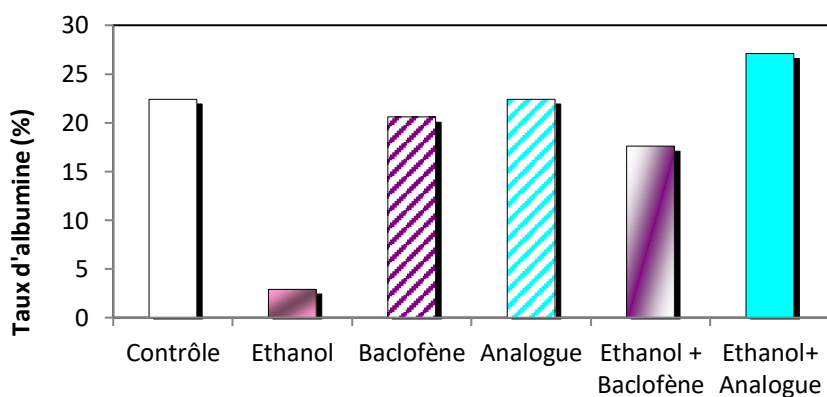


Figure 27: Effet du baclofène et son analogue sur le taux d'albumine exprimé en (%)

Résultats

3.3. Taux d'alpha 1 globuline :

Les résultats révèlent que l'éthanol, le baclofène ou l'analogue augmentent les taux des globulines alpha 1 (**fig.28**).

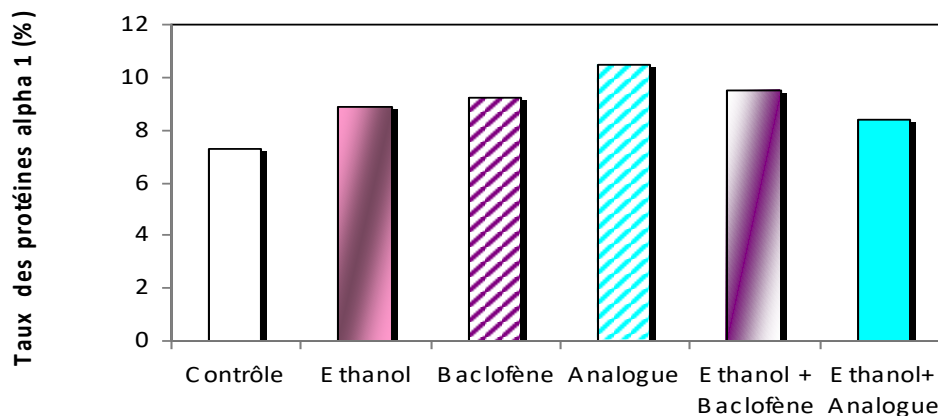


Figure 28: Effet du baclofène et son analogue sur le taux d'alpha 1 globuline exprimé en (%).

3.4. Taux d'alpha 2 globuline :

Résultats de la figure (**fig.29**) révèlent une diminution des taux des globulines alpha 2 chez les rattes présentant une dépendance alcoolique avant ou après traitement par l'analogue du baclofène.

L'administration du baclofène chez les rattes saines ou alcooliques augmente les taux de cette protéine.

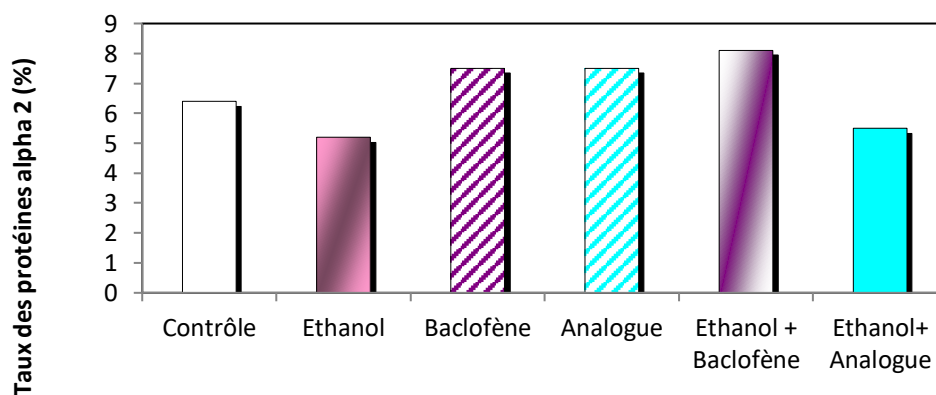


Figure 29: Effet du baclofène et son analogue sur le taux d'alpha 2 globuline exprimé en (%).

Résultats

3.5. Taux de beta 1 globuline :

Les résultats montrent que les taux de beta 1 globuline diminuent chez les rattes traitées par l'éthanol et baclofène, mais aussi chez les rattes alcooliques traitées par l'analogue (fig.30).

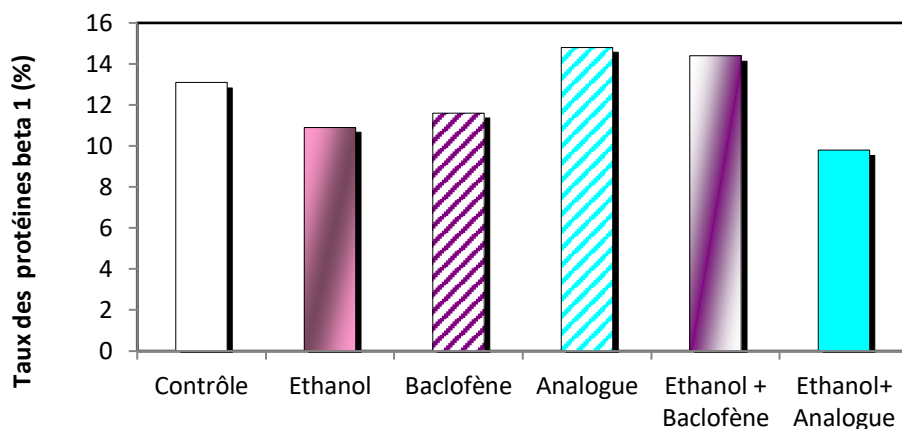


Figure 30: Effet du baclofène et son analogue sur le taux du beta 1 globuline exprimé en (%).

3.6. Taux de beta 2 globuline :

La figure suivante (fig.31) indique que les rattes alcooliques présentent des taux faibles de beta 2 globulines. D'autre part, le baclofène diminue les taux de cette protéine tandis que son nouveau analogue l'augmente.

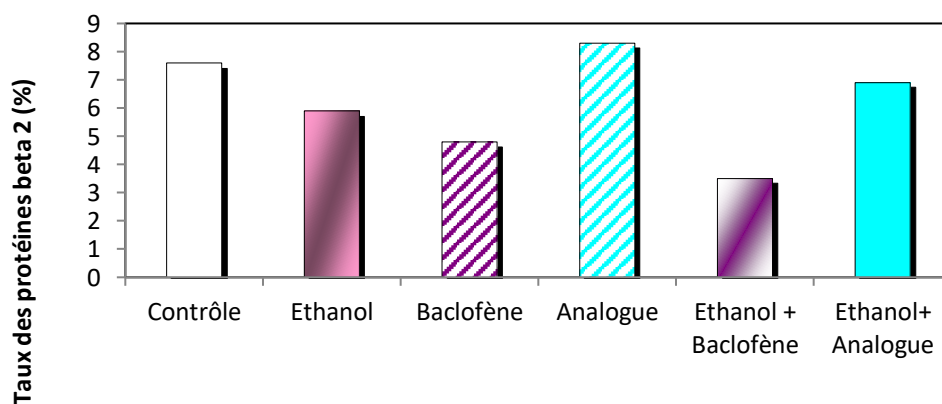


Figure31 : Effet du baclofène et son analogue sur le taux du beta 2 globuline exprimé en (%).

3.7. Taux des protéines gamma globulines :

Nos résultats (**fig.32**) montrent que les rattes alcooliques présentent des taux faibles de gamma globulines. Toutefois, le baclofène administré a des rattes alcooliques ou non augmente le taux de ces globulines. Il est important de signaler que le baclofène administré aux rattes alcooliques augmente les taux de gamma globulines 5 fois que le contrôle.

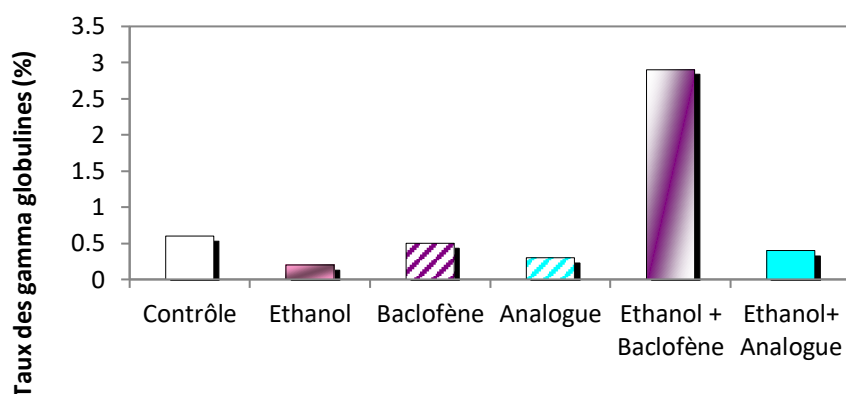


Figure 32: Effet du baclofène et son analogue sur le taux du gamma globuline exprimé en(%).

4. Effet immuno-modulateur du baclofène et son nouveau analogue :

4.1. Effet sur l'immunité humorale :

Après une semaine de l'injection des globules rouges de lapin, on enregistre que le traitement des rattes par le baclofène inhibe la production des anticorps agglutinants comparativement au contrôle. En revanche, le nouveau analogue du baclofène n'a pas d'effet sur la production d'anticorps et notamment sur la réponse humorale.

Cependant, après 15 jours de l'immunisation on note que les taux d'anticorps agglutinants chez les rattes traitées par le baclofène ont augmenté alors qu'ils ont diminué chez le groupe traité par l'analogue.

Il semble que le baclofène appliqué à court terme bloque la réponse humorale et il perd cet effet à long terme. Au contraire, son nouveau analogue n'a pas d'effet à court terme mais il possède un effet inhibiteur à long terme (**Fig.33**).

Résultats

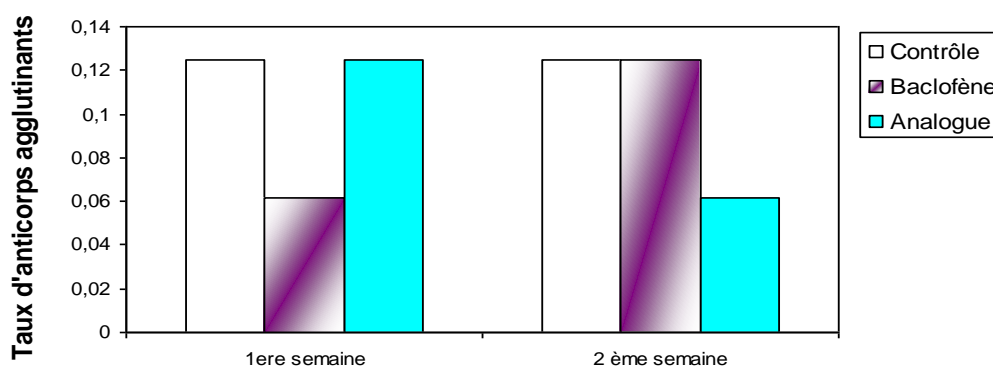


Figure 33: Effet du baclofène et son analogue sur les taux d'anticorps agglutinants.

1.2. Effet sur l'immunité cellulaire :

Après 24 heures de l'injection des globules rouges dans la patte droite on a constaté un gonflement avec formation d'œdème (fig.34)



Figure 34 : Observation macroscopique après l'injection des globules rouges dans la patte droite chez la ratte après 24 h (A : œdème, B : gonflement, C : contrôle).

Le résultat illustré dans la figure ci-dessous (**fig.35**) révèle que l'épaisseur du pied droit est augmentée de manière très significative chez les rattes immunisées par les globules rouges de lapin comparativement au contrôle ($p=0.001$).

Le traitement par le baclofène ou son nouveau analogue diminue significativement l'épaisseur du pied droit après 24 h de l'immunisation ($p=0.016$, $p= 0.004$

Résultats

respectivement). Après 48 heures, l'épaisseur du pied augmente de manière non significative ($p=0.198$, $p=0.534$).

D'autre part, après 1 semaine de l'injection des globules rouges au niveau du pied droit on a réalisé une deuxième injection au niveau du pied gauche les mesures montrent qu'il n'existe aucune variation dans l'épaisseur du pied gauche comparativement au contrôle (**fig. 36**).

Apparemment, le traitement par le baclofène ou son analogue inhibe la réponse immunitaire cellulaire

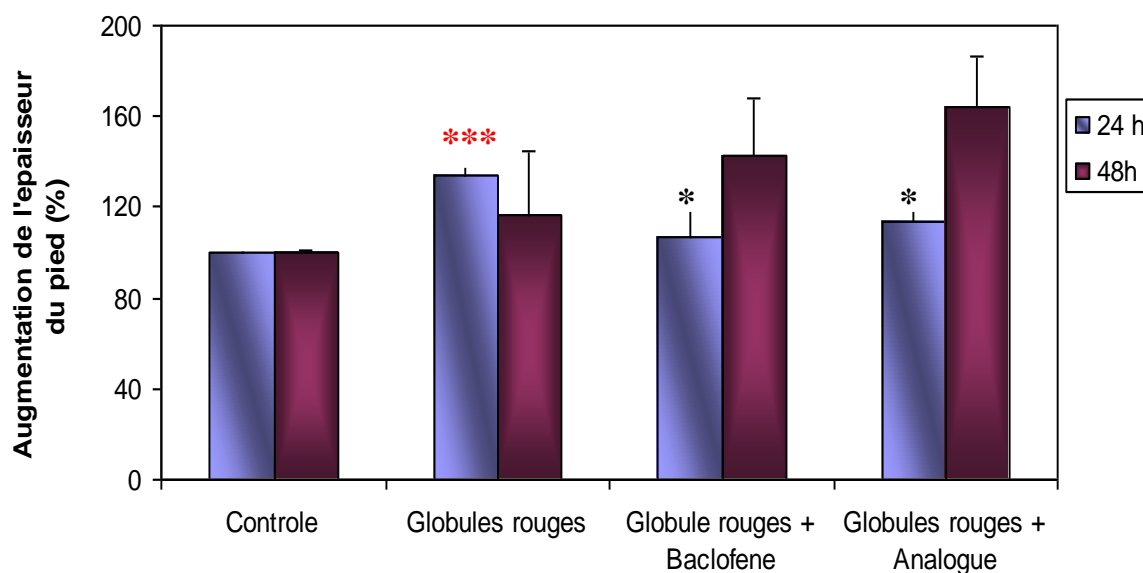


Figure 35: Variation de l'épaisseur du pied droit après 24 h et 48 h de l'immunisation avec les globules rouge de lapin (***) hautement significative comparativement au contrôle,* significative comparativement au GR)

Résultats

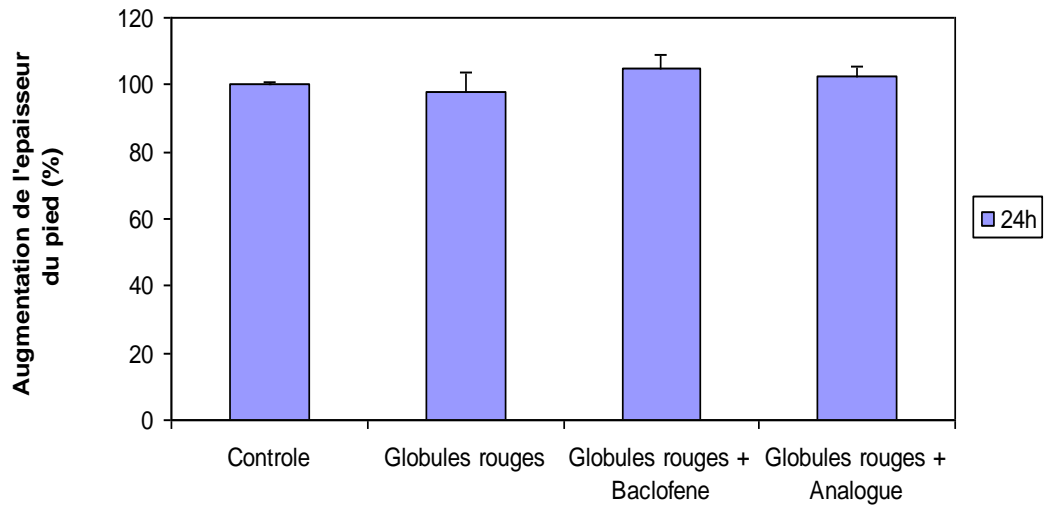


Figure 36: *Variation de l'épaisseur du pied gauche après 24 h de l'immunisation avec les globules rouge de lapin.*

Discussion

V. Discussion :

Le but de notre travail est de tester l'effet du baclofène et son nouveau analogue sur la dépendance alcoolique, les lésions hépatiques induites par l'alcool ainsi, que sur la réponse immunitaire.

1. Développement du modèle alcoolique :

Afin de développer une dépendance alcooliques chez les rats nous avons choisi un protocole, ou les rats ont accès libre à deux biberons ; un biberon d'eau et un autre d'alcool (15 %). Après huit semaines, la consommation d'alcool est arrivée à plus de 30 g/kg avec une augmentation quotidienne de plus ≤ 1 g/kg.

Ces résultats sont en corrélation avec plusieurs d'autres travaux. **Ozburn et al., 2013** ont prouvé que l'accès continu à des concentrations croissantes d'alcool (dans un choix de deux bouteilles) permet la transition d'une consommation modéré à une consommation excessive, en augmentant graduellement la concentration d'alcool (exemple augmentation de 4% à 20% en quelques jours). Les niveaux d'ingestion d'alcool commencent de 1,5 g/kg (à 3% d'alcool) et augmentent jusqu'à 15 g/kg (à 20% d'alcool).

En outre, **Ron et Barak, 2016** ont appliqué le même protocole et ont reporté que la consommation d'alcool augmente quotidiennement a raison de 1 g/kg chez le rats ce qui est en accord avec nos résultats.

D'autre part, le seuil maximal de consommation d'alcool varie non seulement entre les modèles de souris ou de rats mais aussi entre les souches de la même espèce. Des taux variant entre 15 à 20 g/kg ont été enregistrée chez les souris (**Carnicella et al., 2014**).

De même **Griffin, 2015** a annoncé qu'un taux de consommation d'alcool variant de 0,4 à 1 g/kg génère un taux d'alcoolémie de l'ordre de 30 à 90 mg par dl chez les rats.

2. Effet du baclofène et son nouveau analogue sur la dépendance à l'alcool :

Le baclofène agit comme le principal neuromédiateur inhibiteur agoniste du récepteur GABA-B qui se fixe sur le récepteur du neuromédiateur et bloque sa libération. Il diminue ainsi l'activité des neurones qui transmettent les signaux électriques d'un neurone à l'autre (**Simon, 2017**).

Discussion

Le récepteur GABA-B est porté par de nombreux types de neurones, notamment ceux responsables de la sécrétion de la noradrénaline, la sérotonine et la dopamine, neuromédiateurs impliqués dans le circuit de la récompense. Ce dernier est constitué de plusieurs structures cérébrales connectées qui reçoivent toutes des signaux contrôlés par la dopamine. Une augmentation de la libération de dopamine correspond à une sensation de satisfaction. (**Garbutt et al., 2010 ; Vlachou et Markou, 2010**)

Le baclofène est connu depuis longtemps pour ses propriétés antispasmodiques, il est devenu récemment un traitement d'intérêt dans le traitement de l'alcoolodépendance (**Labat et al., 2016**).

Nos résultats montrent que la consommation d'alcool diminue chez les rattes alcooliques à des doses de l'ordre de 3 mg/kg. Cet effet a été largement reporté dans la littérature. **Colombo et al., 2003 ; Ameisen, 2010 ; Lorrai et al., 2016**, ont reporté que le baclofène réduit la consommation d'alcool chez les rats ou les souris exposés au protocole du « home cage » classiques (deux bouteilles d'alcool " a choix" contre l'eau).

Par ailleurs, le nouveau analogue du baclofène, synthétisé par nos collaborateurs de l'université de Tlemcen, est un composé qui a gardé le même site de liaison avec le récepteur GABA que la molécule originale du baclofène avec des modifications dans la forme chimique. Nos résultats ont montré que l'analogue réduit la consommation de l'alcool uniquement la première semaine du traitement. Ceci montre que l'analogue possède la capacité de réduire la consommation de l'alcool mais la dose doit être plus importante (comparativement au baclofène) pour garder l'effet pour une période plus longue.

3. Effet du baclofène et son analogue sur le comportement des animaux :

Le test en champ ouvert développé par Hall et Ballachey (1932) est l'un des approches les plus utilisées dans l'étude du comportement des animaux. C'est un essai initialement destiné à estimer l'activité locomotrice et la capacité d'exploration des rongeurs (**Perals et al., 2017**). Cependant, l'interprétation de l'open field n'est pas aussi simple (**Walsh et Cummins, 1976 ; Bell, 2007 ; Carter et al., 2013**). Par exemple, dans leur examen de l'utilisation d'open field, **Walsh et Cummins, 1976** ont souligné que, outre la mesure de l'exploration, le test peut également être interpréter comme la mesure de l'émotivité, la peur et la néophobie (**Thornton, et Clayton, 2015**). Aussi, **Choleris et al., 2001** ont indiqué que l'OF

permet d'évaluer les effets de drogues sur différents aspects du comportement des animaux notamment la recherche des agents anxiolytiques.

Nos expériences montrent que les rattes traitées par le baclofène ou par son analogue passent plus de temps dans le centre que les rattes alcooliques. Ceci s'explique par la capacité des deux composés à réduire l'anxiété chez les rattes.

L'effet du baclofène sur l'anxiété était l'objet de l'étude de **Amikishieva et Semendyaeva, 2007** qui ont rapporté que cet effet dépend de l'état psychologique et émotionnel de l'animale. L'étude a annoncé que le baclofène possède un effet anxiolytique chez les rats sains, par contre cet effet diminue chez les rats anxieux. Ces résultats sont en accord avec les notre, ou on a noté que le baclofène administré chez les rattes saines augmente le temps passé dans le centre (indicateur d'un effet anxiolytique) par contre il est sans effet chez les rattes alcooliques.

D'autre part, en comparaison avec le baclofène notre nouveau agoniste du récepteur GABA possède moins d'effet sur les rattes saines, mais plus d'effet anxiolytique sur rattes alcooliques qui est un avantage par rapport à la molécule originale.

Dans la présente étude nos résultats du test light/ dark box révèlent que les rattes passent plus de temps dans l'obscurité que dans la zone claire. Cette observation est noté même chez les rattes contrôle. Ceci s'explique par une néophobie chez les rattes qui explorent l'endroit pour la première fois.

En plus en remarque que le traitement par le baclofène seul entraîne une augmentation du temps passé dans la zone claire chez les rattes saines ceci concorde avec les résultats de l'open Field et prouve l'effet anxiolytique du baclofène.

Il est important de noté que l'analogue de baclofène n'a pas d'effet sur la durée que passe les animaux dans chaque compartiment.

4. Effet des différents traitements sur les lésions hépatiques :

L'effet des différents traitements ont été testé sur l'activité des trois enzymes γ GT, TGP, TGO qui sont utilisées pour diagnostiquer les lésions tissulaires hépatiques induites par l'alcool (**Laskin et al., 1995; Waters et al, 2001 ; Whyte et al., 2007**).

L'enzyme gamma GT est l'une des marqueurs très anciens efficace en termes de sensibilité et surtout de spécificité. L'augmentation du gamma GT liée à l'induction enzymatique en rapport avec la consommation d'éthanol. La gamma GT est élevée dans 35 à 90 % des cas d'alcoolisme (**Trabut et Pol, 2013**)

Discussion

TGO et TGP sont des enzymes libérés dans le sang en cas de lésions hépatiques aigues, ce sont des indicateurs importants de l'hépatotoxicité (**Laskin et al., 1995; Waters et al., 2001 ; Whyte et al., 2007**).

L'effet de l'éthanol a été largement reporté en bibliographie sur les lésions hépatiques (**Habib-ur-Rehman et al., 2011**).

L'agoniste du récepteur GABA, baclofène semble avoir un effet hépatotoxique vu qu'il augmente l'activité des trois enzymes chez les rattes saines. Cet effet a été également reporté par **Elmesallamy et Abdel Fattah, 2013**.

Cette même étude a reporté que le baclofène est moins toxique sur les rats alcooliques, il réduit l'activité des enzymes γ GT, TGP, TGO ce qui est en accord avec nos résultats.

Une étude clinique prospective a été effectuée par **Owens et al., 2015** sur des patients ayant des maladies alcooliques du foie ou les marqueurs biochimiques γ GT, TGP ont été comparées à ceux des patients traités aux baclofène. L'analyse a montré que le baclofène est bien toléré. Il a un impact positif sur la consommation d'alcool et l'ensemble des paramètres de la fonction hépatique et les effets nuisibles de l'alcool.

Une autre étude réalisée par **Addolorato et al., 2007** a également prouvé que le baclofène est un agent très efficace à la promotion de l'abstinence d'alcool chez les patients alcoolodépendants présentant une cirrhose hépatique. Le médicament est bien toléré et pourrait avoir un rôle important dans le traitement de ces patients. Aussi, **Yamini et al., 2014** ont suggéré que l'utilisation de baclofène maintient l'abstinence d'alcool et améliore les marqueurs hépatiques chez des patients atteints de cirrhoses alcooliques.

Concernant le nouveau analogue du baclofène, les résultats montrent qu'il diminue l'activité des enzymes TGP, TGO. En comparaison avec le baclofène, apparemment l'analogue possède moins d'effet toxique que la molécule originale sur les rattes saines, mais aussi il possède un effet hépatoprotecteur plus important contre les lésions induites par l'éthanol (vu qu'il réduit l'activité des enzymes TGP et TGO).

5. Effet des différents traitements sur les protéines sériques :

L'électrophorèse des protéines sériques constitue un des examens les plus pratiqués dans les laboratoires. Il s'agit d'une méthode simple qui permet la séparation de six fractions de protéines (albumine, alpha1, alpha2, bêta 1, bêta 2 et gamma globulines) (**Dahmouni et al., 2009**)

L'électrophorèse donne un reflet panoramique sur l'ensemble des protéines sériques et peut à ce titre dépister ; l'existence ou non d'un syndrome inflammatoire (zones alpha-1 et alpha-2), une carence martiale (zone bêta), une hémolyse intra-vasculaire (zone alpha-2), une cirrhose (zone bêta-gamma), une maladie infectieuse, auto-immune ou maladie du système (zone alpha-1, alpha-2, bêta et surtout gamma), un déficit congénital ou acquis des immunoglobulines ou d'autres protéines (albumine, alpha-1 antitrypsine et gammaglobulines notamment) (Szymanowicz et al., 2006).

5.1. Effet de l'éthanol sur les protéines sériques :

L'analyse du sérum des rattes traitées par l'éthanol indique que ce dernier inhibe la synthèse de de l'albumine et des gammas globulines. L'albumine est une protéine synthétisée et sécrétée essentiellement par le foie. (Lee et Xiaoyang, 2015). Selon Rueff, 1989 l'administration de l'alcool entraîne en quelques jours une hyper uricémie et pour effet une diminution de la synthèse et surtout de relargage de l'albumine par les hépatocytes.

En ce qui concerne le développement d'une maladie alcoolique hépatique plusieurs facteurs ont été suggérés. En particulier, les acétaldéhydes dérivant du métabolisme de l'éthanol s'est avéré former des adduits stables avec des protéines du plasma circulant, telles que l'albumine. Ces derniers seront reconnus par le système immunitaire comme étranger. Plusieurs études ont montré l'apparition qu'une réaction d'hypersensibilité de type I produisant des anticorps de type IgE contre ces adduits chez des souris immunisées par des protéines plasmatiques attaché à acétaldéhyde (Romanazzi et al., 2013).

L'inhibition des gammas globulines semble être du a l'inhibition de la production des immunoglobulines.

5.2. Effet de deux analogues sur les protéines sériques

Les résultats montre que les deux analogues du récepteur GABA restore la production ou la libération de l'albumine ce qui confirme l'existence d'un effet hépatoprotecteur.

D'autre part, nos résultats révèlent que le baclofène diminue les protéines beta 2 alors que son analogue l'augmente. Cet effet contradictoire semble lié à la différence de structure des deux agonistes. La zone beta 2 globuline représente les protéines du complément et les β -lipoprotéine (appelé aussi LDL *low density lipoprotein*) (Bhagavan et Ha, 2015).

Les deux agonistes augmentent la fraction gamma globulines qui regroupe les 5 classes d'immunoglobulines IgM, IgG, IgA, IgD et IgE plus la protéine réactive C (CRP) (Stockham ET Scott, 2013). Il est important de signaler que le baclofène stimule fortement la

production de ces protéines, ce qui indique la présence d'une activation de la réponse inflammatoire.

6. Effet immuno-modulateur :

Le traitement avec le baclofène ou son analogue inhibe la réponse immunitaire et la production des anticorps. Il retarde l'apparition de la réponse humorale et cellulaire (augmentation de l'épaisseur du pied après 48 heures). L'effet inhibiteur sur la production des anticorps semble résulter d'un déficit dans l'activation des lymphocytes T (**Jin et al., 2013**). Aussi, le traitement par le GABA entraîne une réduction des taux des immunoglobulines G chez les souris après immunisation par le collagène bovine (**Duthey et al., 2010**).

Par ailleurs, le protocole de l'immunisation au niveau du pied est un protocole qui permet de mesurer la réaction d'hypersensibilité retardée et la réponse inflammatoire. Le baclofène semble avoir un effet inhibiteur sur l'hypersensibilité retardée et l'inflammation, la réduction de l'épaisseur du pied est due à l'inhibition de l'infiltration des cellules inflammatoires. Cette observation est en accord avec l'étude de **Duthey et al., 2010** sur des souris C57BL/6 où l'injection intra- péritonéale du baclofène inhibe la réaction d'hypersensibilité retardée et réduit la réponse inflammatoire au niveau des oreilles. Aussi, le traitement avec le baclofène après immunisation par les LPS entraîne une réduction de la production des cytokines inflammatoires l'IL-6 et l'IL-12 (**Samotrueva et al., 2010**).

En effet, en contradiction avec nos résultats, l'injection d'un autre agoniste du récepteur GABA le phenibut augmente l'hypersensibilité retardée et l'activité phagocytaire des neutrophiles. Il a été reporté que le phenibut rétablit la réponse immunitaire et supprime l'effet du cyclophosphamide, un immunosuppresseur qui inhibe la réaction d'hypersensibilité retardée et la production des anticorps (**Tyurenkov et al., 2009**).

*Conclusion et
perspectives*

VI. Conclusion et perspectives :

Notre étude a été menée dans le but de tester l'effet d'un analogue du baclofène, agoniste du récepteur GABA, sur un modèle animal de dépendance alcoolique. Les effets des deux composés ont été évalués sur les lésions hépatiques induites par alcool éthylique, le profil des protéines sériques et la réponse immunitaire.

Nos résultats montrent que le baclofène et son analogue diminuent la consommation de l'alcool, ils possèdent un effet anxiolytique. Néanmoins, la dose de l'analogue doit être plus élevée que celle du baclofène.

D'autre part, les deux analogues du récepteur GABA ont un effet hépato-protecteur démontré par la réduction de l'activité des trois enzymes, marqueurs de lésions hépatiques γ GT, TGP, TGO. Il est important de signaler que le baclofène et son analogue administrés seuls ont des effets toxiques sur le foie des rattes saines. L'analogue du baclofène est effectivement moins toxique.

L'électrophorèse des protéines sériques montre que l'éthanol supprime la production de l'albumine et du gamma globulines. Cependant, les deux analogues restaurent la production de ces protéines mais le baclofène possède plus d'effet. Les deux analogues ont des effets contradictoires sur certaines protéines sériques, notamment sur la beta 2 globuline, le baclofène diminue les taux de ces protéines alors que l'analogue l'augmente ces variations sont liées à la variation de la structure chimique.

L'effet immuno-modulateur des deux composés a été testé sur un modèle d'immunisation par les globules rouges de lapin. Les taux d'anticorps agglutinants ont été mesurés comme indicateur sur la réponse humorale alors la réaction d'hypersensibilité retardée à travers l'immunisation au niveau du pied nous a donné une idée sur l'effet du baclofène et son analogue sur la réponse cellulaire. Nos résultats indiquent que les deux analogues du récepteur GABA inhibent la réponse immunitaire humorale et cellulaire et retardent de ce fait, les réactions d'hypersensibilités.

En conclusion, l'analogue du baclofène possède un effet inhibiteur sur la consommation d'alcool mais les doses utilisées doivent être plus importantes que celles du baclofène, il est moins toxique que le baclofène, mais il a les mêmes effets sur la réponse inflammatoire et immunitaire. Avec ses caractéristiques le nouveau analogue du baclofène semble plus approprié au traitement de la sclérose en plaque que le baclofène.

Conclusion et perspectives

En perspectives il serait intéressant de :

- tester l'effet du baclofène et son analogue sur d'autres modèles d'anxiété.
- tester l'effet du baclofène et son analogue sur d'autres paramètres de la réponse inflammatoire et immunitaire.
- réaliser une étude histologique pour prouver l'effet hépato-protecteur.
- effectuer une étude moléculaire et cellulaire profonde pour mieux comprendre le mode d'action des analogues du récepteur GABA.
- étudier l'effet de l'analogue sur la sclérose en plaque.

*Références
bibliographiques*

VII. Les références :

- Addolorato G, Leggio L, Ferrulli A, Cardone S, Bedogni G, Caputo F, Gasbarrini G, Landolfi R, (2011) *Baclofen Study Group. Alcohol Alcohol. May-Jun; 46(3), pp. 312-7.*
- Addolorato, G., Leggio, L., Ferrulli, A., Cardone, S., Vonghia, L., Mirijello, A., et al. (2007). Effectiveness and safety of baclofen for maintenance of alcohol abstinence in alcohol-dependent patients with liver cirrhosis: randomised, double-blind controlled study. *Lancet* 370, pp. 1915–1922.
- Altamirano, J. and Bataller, R. (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(9), pp.491-501.
- Ameisen O, de Beaurepaire R. (2010) Suppression de la dépendance à l'alcool et de la consommation d'alcool par le baclofène à haute dose: un essai en ouvert – Suppression of alcohol dependence using high-dose baclofen: An observational study. *Ann Med Psychol*;168, pp. 159–162.
- Ameisen, O. (2005). Complete and prolonged suppression of symptoms and consequences of alcohol-dependence using high-dose baclofen: a self-case report of a physician. *Alcohol Alcohol.* 40, pp. 147–150.
- Ameisen, O., & De Beaurepaire, R. (2010). Suppression de la dépendance à l'alcool et de la consommation d'alcool par le baclofène à haute dose: un essai en ouvert. In *Annales Médico-psychologiques, revue psychiatrique*, 168(2), pp. 159-162.
- Amikishieva AV, Semendyaeva SN. (2007). Effects of baclofen on anxiety, sexual motivation, and olfactory perception in male mice in different psychoemotional states. *Neurosci Behav Physiol.* 37(9), pp. 929-37.
- Aravinthan, A., Scarpini, C., Tachtatzis, P., Verma, S., Penrhyn-Lowe, S., Harvey, R., & Alexander, G. (2013). Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 58(3), pp. 549-556.
- Attignon, E., Rouach, H. and Blanc, E. (2015). Bases moléculaires des effets toxiques de l'alcool. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 50(2), pp.84-93.
- Aubin, H. J., Auriacombe, M., Reynaud, M., & Rigaud, A. (2013). Implication pour l'alcoologie de l'évolution des concepts en addictologie: De l'alcoolisme au trouble de l'usage d'alcool. *Alcoologie et addictologie*, 35(4), pp. 309-315.

Les références

- Aubin, P. H. J., Luquiens, A., & Benyamina, P. A. (2015). Approches pharmacologiques du trouble de l'usage d'alcool. *Alcoologie et Addictologie*, 37(3), pp.205-211.
- Augsburger, M. and Favrat, B. (2016). Le point sur l'éthanol (alcool éthylique) et l'interprétation forensique. *PRAXIS*, 105(24), pp.1421-1425.
- **B**acon, E., & Viennot, F. (1990). Le système complexe des récepteurs GABA-benzodiazépine. *médecine/science*; 6(9), pp.770- 7
- Bell, A. M. (2007). Future directions in behavioural syndromes research. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1611), pp. 755-761.
- Bond, N. W., & Digiusto, E. L. (1975). Changes in open-field behavior following short-term alcohol ingestion by rats. *Psychological reports*, 37(2), pp. 575-578.
- Bruha, R. (2012). Alcoholic liver disease. *World Journal of Hepatology*, 4(3), pp.81.
- **C**arnicella, S., Ron, D., & Barak, S. (2014). Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol*, 48(3), pp.243-252.
- Ceccarelli, S., Nobili, V., & Alisi, A. (2014). Toll-like receptor-mediated signaling cascade as a regulator of the inflammation network during alcoholic liver disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(44), pp. 16443.
- Cesbron, A., Loilier, M., Mariau, Y., Briand, F., Le Boisselier, R., Lelong-Boulouard, V., & Bourguine, J. (2017). Le baclofène, un vrai faux-ami dans le sevrage.... *Toxicologie Analytique et Clinique*, 29(2), pp.S58-S59.
- Choleris, E., Thomas, A.W., Kavaliers, M., Prato, F.S., (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequently pulsed magnetic field. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, pp. 235–260.
- Chui LK, Pelot D. (1984). Hepatic enzyme elevations associated with baclofen. 3(2); pp.196- 7.
- Clugston, R. D., Yuen, J. J., Hu, Y., Abumrad, N. A., Berk, P. D., Goldberg, I. J., ... & Huang, L. S. (2014). CD36-deficient mice are resistant to alcohol-and high-carbohydrate-induced hepatic steatosis. *Journal of lipid research*, 55(2),pp. 239-246.
- Colombo, G., Vacca, G., Serra, S., Brunetti, G., Carai, M. A., & Gessa, G. L. (2003). Baclofen suppresses motivation to consume alcohol in rats. *Psychopharmacology*, 167(3), 221-224.

Les références

- **D**ahmouni, A., Ismail, O. B., Bouakkez, H., Nahdi, I., & Yalaoui, S. (2009). Apparition d'une bande additionnelle à l'électrophorèse des protéines après traitement d'un sérum par l'éthanol. *Revue Francophone des Laboratoires*, 412(10), pp. 67-69.
- Dahmouni, A., Ismail, O. B., Bouakkez, H., Nahdi, I., & Yalaoui, S. (2009). Apparition d'une bande additionnelle à l'électrophorèse des protéines après traitement d'un sérum par l'éthanol. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2009(412), pp. 67-69.
- Daniel E. Irons, PhD,¹ William G. Iacono, PhD,¹ William S. Oetting, PhD,² Robert M. Kirkpatrick, MA,¹ Scott I. Vrieze, PhD,³ Michael B. Miller, PhD,¹ and Matt McGue, PhD¹.(2014). GABA System Genes – No Evidence for a Role in Alcohol Use and Abuse in a Community-based Sample. *Alcohol Clin Exp Res*; 38(4), pp. 938–947.
- De Beaurepaire, R. (2011). Traitement de l'alcoolisme par le baclofène. *PSN*, 9(1), pp.1-6.
- Dietrich, C. (2016). Molecular changes in hepatic metabolism and transport in cirrhosis and their functional importance. *World Journal of Gastroenterology*, 22(1), pp.72.
- Dupont, B., Dao, T., & Piquet, M. A. (2011). Hépatite alcoolique aiguë: prise en charge en 2011. *Réanimation*, 20(4), pp. 335-342.
- Duthey B, Hübner A, Diehl S, Boehncke S, Pfeffer J, Boehncke WH. (2010). Anti-inflammatory effects of the GABA (B) receptor agonist baclofen in allergic contact dermatitis. *Exp Dermatol*. 19, pp. 661-6.
- **E**isabetta Ceni, Tommaso Mello, and Andrea Galli. (2014). Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism *World J Gastroenterol.*; 20(47),pp. 17756–17772.
- El-Karakasy, H., Anwar, G., El-Raziky, M., Mogahed, E., Fateen, E., Gouda, A., ... & El-Hennawy, A. (2014). Glycogen storage disease type III in Egyptian children: A single centre clinico-laboratory study. *Arab Journal of Gastroenterology*, 15(2), pp. 63-67.
- Elmesallamy GE, Abdel Fattah NR. (2013). Toxicological evaluation of the neuroendocrinologic, pancreatic and hepatic effects of baclofen in alcohol dependent albino rats. *Z.U.M.J.* 19(1).

Les références

- Elmesallamy, G. E., & Fattah, N. R. A. (2015). TOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE NEUROENDOCRINOLOGIC, PANCREATIC AND HEPATIC EFFECTS OF BACLOFEN IN ALCOHOL DEPENDENT ALBINO RATS. *Zagazig University Medical Journal*, 19(1).
- Enoch, M., Baghal, B., Yuan, Q. and Goldman, D. (2013). A Factor Analysis of Global GABAergic Gene Expression in Human Brain Identifies Specificity in Response to Chronic Alcohol and Cocaine Exposure. *PLoS ONE*, 8(5), pp.640-14.
- *F. PAILLE* et *L. MALET*. (2011). baclofène et alcool.
- Fabbrini, E., Sullivan, S., & Klein, S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*, 51(2), pp. 679-689.
- François Vabret, Coralie Lannuzel, Nicolas Cabe, Ludivine Ritz, Céline Boudehent, Francis Eustache, Anne Lise Pitel, Hélène Beaunieux. (2016). Troubles cognitifs liés à l'alcool : nature, impact et dépistage. *La Presse Medicale*, 45(12), pp.1124-1132
- Fujii, H. (2014). Fibrogenesis in alcoholic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(25), pp.80-48.
- *Gangadharan B, Antrobus R, Dwek RA, Zitzmann N Clin Chem.*(2007); 53(10)pp.1792-9.
- Gao, B., Seki, E., Brenner, D., Friedman, S., Cohen, J., Nagy, L., Szabo, G. and Zakhari, S. (2011). Innate immunity in alcoholic liver disease. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(4), pp.G516-G525.
- Garbutt JC, Kampov-Polevoy AB, Gallop R, Kalka-Juhl L, Flannery BA (2010) Efficacy and safety of baclofen for alcohol dependence: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alcohol Clin Exp Res*; 34(11), pp. 1849-57
- Gicquel, T., Lepage, S. and Morel, I.(2016). Ethylglucuronide et éthylsulfate, marqueurs biologiques de la consommation d'alcool. *Revue Francophone des Laboratoires*, (479), pp.69-74.
- Goujon, Y., Attouche, J., Duval, L., Garderet, J., Matray, M. and Robin, F. (2009). Évaluation de l'imprégnation en éthanol lors de dégustations professionnelles de boissons alcoolisées. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*, 70(5), pp.550-557.

Les références

- Goullé, J. and Guerbet, M. (2015). Éthanol : pharmacocinétique, métabolisme et méthodes analytiques. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 73(5), pp.313-322.
- Griffin, M.C. Diquelou. (2015), Innovative problem solving in birds: A cross-species comparison of two highly successful passerines *Animal Behaviour*, 100, pp. 84–94
- Griffin, W. C. III, Lopez, M. F. & Becker, H. C. (2009). Intensity and duration of chronic ethanol exposure is critical for subsequent escalation of voluntary ethanol drinking in mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 33, pp. 1893–1900.
- *H*abib-ur-Rehman M¹, Tahir M, Lone KP, Sami W. (2011). Ethanol induced hepatotoxicity in albino rats. *J Coll Physicians Surg Pak.* 21(10), pp. 642-3
- Haque MR, Ansari SH and Azhar Rashikh A. (2013). Coffea arabica Seed Extract Stimulate the Cellular Immune Function and Cyclophosphamide-induced Immunosuppression in Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 12 (1), pp. 101-108
- Harper, C. (2009). The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol & Alcoholism*, 44(2), 136-140.
- Hernández, J., López-Sánchez, R. and Rendón-Ramírez, A. (2016). Lipids and Oxidative Stress Associated with Ethanol-Induced Neurological Damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp.1-15.
- Huas, D., & Rueff, B. (2005). *Abord clinique des malades de l'alcool: en médecine générale.* Springer Science & Business Media.
- *M*MG, N. Q. (2015). Baclofène et sevrage de l'alcool. Médicament miracle ou vaste fumisterie?. *Médecine*, 11(6), pp.276-280.
- *J*.-B. Trabut, V. Thépot , P. Sogni , S. Pol (2012). Hépatite alcoolique aiguë. *La Revue de médecine interne* 33, pp.311–317
- J.-C.Garbutt *et al.*, 2010. Efficacy and safety of baclofen for alcohol dependence: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, (34), pp. 1849-1857.
- Jaurigue, M. (2014). Therapy for alcoholic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(9), p.2143.
- Jeong, J. (2008). Chronic gastrointestinal symptoms and quality of life in the Korean population. *World Journal of Gastroenterology*, 14(41), p.6388.

Les références

- Jin Z, Mendu SK, Birnir B. 2013. GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino Acids*. 45, pp. 87–94
- Khan, I., Karim, N., Ahmad, W., Abdelhalim, A. and Chebib, M. (2016). GABA-A Receptor Modulation and Anticonvulsant, Anxiolytic, and Antidepressant Activities of Constituents from *Artemisia indica* Linn. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp.1-12.
- Kintz, P. and Raul, J. (2016). Entactogènes (MDMA) et soumission chimique. *La Revue de Médecine Légale*, 7(2), pp.71-74.
- Kirpich, I. A., & McClain, C. J. (2012). Probiotics in the treatment of the liver diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, 31(1), pp. 14-23.
- Körmöczi GF, Säemann MD, Buchta C, Peck-Radosavljevic M, Mayr WR, Schwartz WM, et al. (2006) Influence of clinical factors on the haemolysis marker haptoglobin. *Eur J Clin Invest*; 36, pp.202–9.
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., ... & Lowe, S. W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 134(4), pp. 657-667.
- L. Bell, R., M. Franklin, K., R. Hauser, S. and C. Zhou, F. (2012). Introduction to the Special Issue “Pharmacotherapies for the Treatment of Alcohol Abuse and Dependence” and a Summary of Patents Targeting other Neurotransmitter Systems. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 7(2), pp.93-112.
- Labat, L., Goncalves, A., Cleophax, C., Megarbane, B., & Decleves, X. (2016). Dosage du baclofène dans le plasma en chromatographie phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem: à propos d’un cas de surdosage. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 28(3), pp.211-217.
- Labat, L., Goncalves, A., Cleophax, C., Megarbane, B., & Decleves, X. (2016). Dosage du baclofène dans le plasma en chromatographie phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem: à propos d’un cas de surdosage. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 28(3), 211-217.
- Lanthier, N. and Spahr, L. (2016). SPINK1, macrophages et cellules progénitrices du foie. *médecine/sciences*, 32(2), pp.149-152.

Les références

- Lanthier, Nicolas; Spahr, Laurent. (2016). *SPINK1, hepatic macrophages and progenitor cells: new tools for liver regeneration in alcoholic hepatitis?* *M/S : médecine sciences*, 32(2), pp. 149-152
- Laskin, D. L., & Pendino, K. J. (1995). Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 35(1), 655-677.
- Lee, Y., Liao, J., Cheng, Y., Wu, T., Lee, S., Liu, J. and Yin, S. (2013). Inhibition of human alcohol and aldehyde dehydrogenases by acetaminophen: Assessment of the effects on first-pass metabolism of ethanol. *Alcohol*, 47(7), pp.559-565.
- Leggio L, Garbutt JC, Addolorato G. (2010). Effectiveness and safety of baclofen in the treatment of alcohol dependent patients. *CNS Neurol Disord Drug Targets*; 9, pp.33–44.
- Linden, A. M., Schmitt, U., Leppä, E., Wulff, P., Wisden, W., Lüddens, H., & Korpi, E. R. (2011). Ro 15-4513 antagonizes alcohol-induced sedation in mice through $\alpha\beta\gamma 2$ -type GABAA receptors. *Frontiers in neuroscience*, 5.
- Lorrain, I. (2016). P.2.001 Reducing effect of saikosaponin A on alcohol self-administration in rats: possible involvement of the GABAB receptor. *European Neuropsychopharmacology*, 26, pp.S25-S26.
- Louvet, A. and Mathurin, P. (2015). Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(4), pp.231-242.
- **M**artínez-Esparza, M., Tristán-Manzano, M., Ruiz-Alcaraz, A. J., & García-Peñarrubia, P. (2015). Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. *World journal of gastroenterology*, 21(41), pp. 11522.
- Mathurin, P., Moreno, C., Samuel, D., Dumortier, J., Salleron, J., Durand, F., ... & Dharancy, S. (2011). Early liver transplantation for severe alcoholic hepatitis. *New England Journal of Medicine*, 365(19), pp. 1790-1800.
- Morel I, Anger JP. (2012) L'alcool éthylique et éthyliisme. Dans : Kintz P, Toxicologie médico-légale, Edition Elsevier; pp. 279-298.
- Mutlu, E. A., Gillevet, P. M., Rangwala, H., Sikaroodi, M., Naqvi, A., Engen, P. A., ... & Keshavarzian, A. (2012). Colonic microbiome is altered in alcoholism. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(9), pp. G966-G978.

Les références

- Muzyk AJ, Rivelli SK, Gagliardi JP. (2012). Defining the role of baclofen for the treatment of alcohol dependence: a systematic review of the evidence. *CNS Drugs*; 26(1), pp. 69-78.
- *N*ovel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients.
- *O*bata K (2013) Synaptic inhibition and gamma-aminobutyric acid in the mammalian central nervous system. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 89:139-156
- Odile Sergenta,*^b, Normand Podechara^b, Fatiha Aliche-Djoudia^b, Dominique Lagadic-Gossmanna. (2014) Acides gras polyinsaturés oméga 3 et toxicité hépatique de l'éthanol : rôle duremodelage membranaire. *Nutrition clinique et métabolisme* 28, pp.17–28
- Owens, L., Rose, A., Thompson, A., Pirmohamed, M., Gilmore, I., & Richardson, P. (2015). Baclofen: Maintenance of Abstinence in Alcohol Dependent Patients Attending a Joint Liver and Alcohol Treatment Clinic. *European Psychiatry*, 30, pp. 503.
- Ozburn, A. R., Falcon, E., Mukherjee, S., Gillman, A., Arey, R., Spencer, S., & McClung, C. A. (2013). The role of clock in ethanol-related behaviors. *Neuropsychopharmacology*, 38(12), pp.2393-2400.
- *P*erals, D., Griffin, A., Bartomeus, I. and Sol, D. (2017). Revisiting the open-field test: what does it really tell us about animal personality?. *Animal Behaviour*, 123, pp.69-79.
- Perier C, Chamson A, Engler R, Frey J. (1983) Evolutionary changes in acute phase proteins in alcoholic hepatocellular diseases. *Clin Chem*; 29, pp.45–7.
- Pham, P., Suybeng, V., Takka, M., Bosselut, N., Sobesky, R., Hamelin, J., Samuel, D., Saffroy, R. and Lemoine, A. (2017). Cirrhose et carcinome hépatocellulaire : diagnostic et suivi biologique. *Revue Francophone des Laboratoires*, (490), pp.64-71.
- Pietropaolo, S. (2010). Mood and Anxiety-related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests - Edited by T. D. Gould. *Genes, Brain and Behavior*, pp .no-no.
- Popova, E. (2014). Ionotropic GABA Receptors and Distal Retinal ON and OFF Responses. *Scientifica*, pp.1-23.

Les références

- **R**omanazzi, V., Schilirò, T., Carraro, E. and Gilli, G. (2013). Immune response to acetaldehyde-human serum albumin adduct among healthy subjects related to alcohol intake. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2), pp.378-383.
- Roozenbeek, B., Maas, A. and Menon, D. (2013). Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology*, 9(4), pp.231-236.
- **S** Vlachou et A. Markou, (2010). GABA B receptors in reward process, *Advances in Pharmacology*, (58), pp. 315-371.
- Samotrueva MA, Tiurenkov IN, Teplyĭ DL, Kuleshevskaja NR, Khlebtsova EV. (2010). Immune-regulating effect of phenibut under lipopolysaccharide-induced immune stress conditions]. *Eksp Klin Farmakol*. 73, pp. 30 -2.
- Seki, E. (2016). HEDGEHOG Signal in hepatocytes mediates macrophage recruitment: A new mechanism and potential therapeutic target for fatty liver disease. *Hepatology*, 63(4), pp.1071-1073.
- Shashtry, V., Benjamin, J., Shashtry, S., Joshi, Y. and Sarin, S. (2017). Fat mass and visceral fat inversely correlate with disease severity in patients with liver cirrhosis - a Bioelectrical impedance analysis based study. *Journal of Hepatology*, 66(1), p.S566.
- Silveri, M. (2014). Neurobiological and neuropsychological consequences of substance abuse in adolescents. *Neurotoxicology and Teratology*, 43, p.76.
- Simon, N. (2017). Nouveaux traitements dans les addictions à l'alcool: aspects cliniques et pharmacologiques. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 29(2), pp. S26.
- ssa, S. Y., Hafez, E. M., El-Banna, A. S., Abdel Rahman, S. M., AlMazroua, M. K., & El-Hamd, M. A. (2017). Baclofen systemic toxicity: Experimental histopathological and biochemical study. *Human & Experimental Toxicology*, 0960327117712369
- Szabo, G. and Petrasek, J. (2015). Inflammasome activation and function in liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(7), pp.387-400.
- Szymanowicz, A., Cartier, B., Couaillac, J. P., Gibaud, C., Poulin, G., Rivière, H., & Le Carrer, D. (2006, July). Proposition de commentaires interprétatifs prêts à l'emploi pour l'électrophorèse des protéines sériques. In *Annales de Biologie Clinique* 64 (4), pp. 367-380.
- **T**eixeira-Clerc, F. (2015). Effets hépatiques de l'alcool. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 50(2), pp.94-102.

Les références

- Thill, C., Di Constanzo, L., Pessey, F., Aries, P., Montelescaut, É., Sapin, J., ... & Drouillard, I. (2016). Intoxication médicamenteuse volontaire au baclofène: du coma calme hypotonique à l'état de mal épileptique. In *Annales de Biologie Clinique* 74(3), pp. 348-352.
- Thornton A., Clayton N.S. (2015) Neophobia is not only avoidance; improving neophobia tests by combining cognition and ecology. *Current Opinion in Behavioral Sciences*. 6, pp. 82–89.
- Trabut, J. and Pol, S. (2013). Alcool et marqueurs biologiques. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2013(449), pp.25-27.
- Trabut, J. and Pol, S. (2013). Alcool et marqueurs biologiques. *Revue Francophone des Laboratoires*, (449), pp.25-27.
- Trabut, J., Thépot, V., Terris, B., Sogni, P., Nalpas, B. and Pol, S. (2014). Évaluation pronostique de la maladie alcoolique du foie : comment et pourquoi ?. *La Presse Médicale*, 43(2), pp.124-134.
- Tyacke RJ, Lingford-Hughes A, Reed LJ, Nutt DJ. (2010) GABAB receptors in addiction and its treatment. *Adv Pharmacol*; 58, pp. 373-96.
- Tyurenkov IN, Samotrueva MA. Comparative Study of Immunocorrective Activity of Phenibut and Its Organic Salts in Experimental Immunodeficiency. (2009). *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*.147, pp. 606-608
- Vendruscolo, L. F. & Roberts, A. J. (2014). Operant alcohol self-administration in dependent rats: focus on the vapor model. *Alcohol* 48, pp. 277–286
- Vendruscolo, L. F., & Roberts, A. J. (2014). Operant alcohol self-administration in dependent rats: focus on the vapor model. *Alcohol*, 48(3), pp. 277-286.
- Vincent, J. L., Patel, G. H., Fox, M. D., Snyder, A. Z., Baker, J. T., Van Essen, D. C., ... & Raichle, M. E. (2007). Intrinsic functional architecture in the anaesthetized monkey brain. *Nature*, 447(7140), 83-86.
- Voican, C. S., Martin, S., Verstuyft, C., Corruble, E., Perlemuter, G., & Colle, R. (2016). Liver function test abnormalities in depressed patients treated with antidepressants: a real-world systematic observational study in psychiatric settings. *PloS one*, 11(5), e0155234.
- Walker, D. W., & Freund, G. (1973). Impairment of timing behavior after prolonged alcohol consumption in rats. *Science*, 182(4112), pp. 597-599.

Les références

- Walsh, R. N., & Cummins, R. A. (1976). The open-field test: A critical review. *Psychological bulletin*, 83(3), pp. 482.
- Wang, H. J., Gao, B., Zakhari, S., & Nagy, L. E. (2012). Inflammation in alcoholic liver disease. *Annual review of nutrition*, 32, pp.343-368.
- Wierońska, J. M., Stachowicz, K., Nowak, G., & Pilc, A. (2011). The loss of glutamate-GABA harmony in anxiety disorders. In *Anxiety disorders*. InTech.
- Zhou, W. C., Zhang, Q. B., & Qiao, L. (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(23), pp. 7312.

Résumé :

L'objectif de cette étude est de tester les effets anti addiction, hépatoprotecteur et immuno-modulateur d'un nouveau agoniste du baclofène et du récepteur GABA sur la dépendance alcoolique, les lésions hépatiques induites par l'alcool et la réponse immunitaire. L'effet anti addiction du baclofène et son analogue du baclofène a été évalué grâce aux tests de comportement « open field » et « dark light box ». L'effet des deux agonistes du récepteur GABA a été également étudié sur l'activité enzymatique des enzymes TGO, TGP et gamma GT et sur un profil électrophorétique des protéines sériques. L'effet immuno-modulateur est évalué par un test d'agglutination ainsi par une réaction inflammatoire d'hypersensibilité retardée.

Les tests de comportement montrent que l'éthanol engendre des troubles de comportements addictifs alors que le traitement par le baclofène et son analogue les soulage. Les résultats des dosages enzymatiques ont montré que l'éthanol augmente l'activité enzymatique (TGO, TGP et gamma GT) et diminue le taux sériques d'albumine, d'alpha 2 globuline et des gammas globuline. Alors que le baclofène et son analogue diminuent l'activité de ces enzymes. Il inhibe la production des anticorps et la réponse inflammatoire cellulaire.

On conclusion les deux agonistes de récepteur GABA montrent un effet anti addiction dose dépendante, un effet hépatoprotecteur ainsi un effet anti-inflammatoire.

Abstract:

The aim of this study is to test the anti-addiction, hepatoprotector and immunomodulatory effects of a novel baclofen agonist and GABA receptor on alcohol dependence, alcohol-induced hepatic damage and immune response.

The anti-addiction effect of baclofen and its analogue was evaluated using the open-field and dark-light-box behavior tests. The effect of the two agonists of the GABA receptor was also studied on the enzymatic activity of the enzymes TGO, TGP and gamma GT and on an electrophoresis profile of the serum proteins. The immunomodulatory effect is assessed by an agglutination test as well as by an inflammatory reaction of delayed hypersensitivity.

Behavior tests show that ethanol generates addictive behavioral disorders whereas treatment with baclofen and its analogue relieves them. The results of the enzyme assays showed that ethanol increases enzymatic activity (TGO, TGP and gamma GT) and decreases the serum levels of albumin, alpha2 globulin and gamma globulin. While baclofen and its analogue decrease the activity of these enzymes. It inhibits the production of antibodies and the cellular inflammatory response.

On conclusion the two GABA receptor agonists show a dose dependent anti-addiction effect, a hepatoprotector effect as well an anti-inflammatory effect.

الملخص :

الهدف من هذه الدراسة هو اختبار تأثير مثيل الباكلوفين المركب حديثا ضد إدمان الكحول، على تلف الكبد الناجم عن استهلاك الكحول و تأثيره أيضا على الاستجابة المناعية.

تم تقييم التأثير المضاد للباكوفين ومثيله باستخدام اختبارات السلوك :المجال المفتوح واختبار الظلام /ضوء. كما تم دراسة تأثير الجزينتين التي تعد كل منهما مثيل للمستقبل GABA على النشاط الأنزيمي للأنزيمات TGO, TGP و gamma GT وعلى الشريط الكهربائي للبيروتينات في الدم. في حين تم تقييم تأثيرهما على الاستجابة المناعية بواسطة اختبار التراص وكذلك من خلال رد فعل التهابات من فرط الحساسية المتأخر.

بعد معالجة المعطيات أظهرت اختبارات السلوك أن الكحول الإيثيلي يولد اضطرابات سلوكية تسبب الإدمان في حين أن العلاج بالباكوفين ومثيله يخفف من هذه السلوكيات. وأظهرت نتائج مقايسات الإنزيم أن الإيثانول يزيد من النشاط الأنزيمي للأنزيمات المذكورة سابقا ويقلل من مستويات الألبومين في المصل ، ألفا 2 جلوبيولين و مستوى الأجسام المضادة. في حين أن باكوفين و مثيله يقللان من نشاط هذه الإنزيمات. أنه يثبط إنتاج الأجسام المضادة والاستجابة الالتهابية الخلوية.

و في الختام نستنتج ان لكل من الباكلوفين و مثيله تأثير مضاد للإدمان على الكحول يعتمد على الجرعة المستعملة، الى جانب هذا بينت النتائج كذلك أن لهما تأثير ايجابي في تخفيف التلف الكبدي الناجم عن استهلاك الكحول بالإضافة إلى تأثير مضاد للالتهابات.

ETUDE DES EFFETS ANTI-ADDICTION, HÉPATO-PROTECTEUR ET IMMUNO-MODULATEUR D'UN NOUVEAU ANALOGUE DU BACLOFÈNE

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en immunologie-oncologie

L'objectif de cette étude est de tester les effets anti-addiction, hépato-protecteur et immuno-modulateur d'un nouveau agoniste du baclofène et du récepteur GABA sur la dépendance alcoolique, les lésions hépatiques induites par l'alcool, ainsi que la réponse immunitaire. L'effet anti-addiction du baclofène et son analogue a été testé sur un modèle de dépendance alcoolique et les changements comportementaux ont été évalués grâce aux tests de « open field » et « dark/ light box ». L'effet des deux agonistes du récepteur GABA a été également étudié sur l'activité enzymatique des enzymes TGO, TGP et gamma GT et sur le profil électrophorétique des protéines sériques. L'effet immuno-modulateur est étudié sur la réponse humorale (test d'agglutination) ainsi que par une réaction inflammatoire d'hypersensibilité retardée. Les tests de comportement montrent que l'éthanol engendre des troubles de comportements addictifs alors que le traitement par le baclofène et son analogue les soulage. Les résultats des dosages enzymatiques ont montré que l'éthanol augmente l'activité enzymatique (TGO, TGP et gamma GT) et diminue le taux sériques d'albumine, d'alpha 2 globuline et des gammas globuline. Alors que le baclofène et son analogue diminuent l'activité de ces enzymes et restaurent la production de l'albumine et de gamma globuline. D'autre part, les deux analogues du récepteur GABA inhibent la production des anticorps et la réponse inflammatoire cellulaire. En conclusion le baclofène et son analogue montrent un effet anti-addiction, un effet hépato-protecteur et immuno-modulateur.

Mots clés : alcool- dépendance, baclofène, analogue GABA, effet anti-addiction, effet hépato-protecteur, effet immuno-modulateur,

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Dr. LATRECHE Asma (MCB - UFM Constantine),

Rapporteuse : Dr. ELOUAR Ibtissem (MCA - UFM Constantine),

Examinatrice : Dr. GHERIB Asma (MCB - UFM Constantine).

Date de soutenance : 06/07/17