

Table des matières

| | PAGES |
|---|-----------|
| TABLE DES MATIÈRES | 3 |
| REMERCIEMENTS | 7 |
| INTRODUCTION | 11 |
| PREMIÈRE PARTIE : Synthèse Bibliographique | 13 |
| I. Choix des enzymes étudiées et données disponibles | 13 |
| 1. Présentation des enzymes étudiées | 13 |
| i. Transaminases (ALAT et ASAT) | |
| ii. Lactate déshydrogénase (LDH) | |
| iii. Glutamate déshydrogénase (GLDH) | |
| 2. Métabolisme des enzymes étudiées | 14 |
| i. Synthèse | |
| ii. Élimination | |
| - Trajet avant de rejoindre le secteur vasculaire | |
| - Perte d'activité catalytique | |
| - Élimination | |
| 3. Fonctions des enzymes étudiées | 16 |
| i. Transaminases (ALAT et ASAT) | |
| ii. Lactate déshydrogénase (LDH) | |
| iii. Glutamate déshydrogénase (GLDH) | |
| 4. Distributions tissulaires | 17 |
| i. ALAT et GLDH : deux enzymes spécifiques du foie | |
| ii. ASAT et LDH : des enzymes plus ubiquitaires | |
| - ASAT | |
| - LDH | |
| 5. Répartitions cellulaires dans le foie | 22 |
| 6. Activités sériques et plasmatiques usuelles et facteurs de variation | 22 |
| i. Activités sériques et plasmatiques usuelles | |
| ii. Influence de l'âge | |
| iii. Influence du sexe | |
| iv. Existence de rythmes circadiens chez l'homme | |

| | |
|---|-----------|
| 7. Utilité en biochimie clinique | 25 |
| i. Principe de l'utilisation des enzymes en biochimie clinique : test de l'intégrité cellulaire | |
| ii. ALAT et GLDH : marqueurs de cytolysé hépatique | |
| iii. ASAT | |
| iv. LDH | |
| II. Pharmacocinétique des enzymes | 27 |
| 1. Déterminants de la concentration plasmatique d'un analyte | 27 |
| 2. Intérêts de la connaissance de la cinétique des enzymes hépatiques | 28 |
| i. Intérêts de la connaissance de la clairance pour l'utilisation des marqueurs hépatiques | |
| ii. Intérêts de la connaissance du volume de distribution | |
| iii. Intérêts de la connaissance de la biodisponibilité | |
| iv. Évaluation de la quantité d'enzymes libérées par l'organe | |
| v. Évaluation de la masse lésionnelle à partir du profil plasmatique enzymatique | |
| vi. Différence temps de demi-vie / clairance plasmatique | |
| III. Données pharmacocinétiques disponibles sur les enzymes étudiées | 30 |
| 1. Temps de demi-vie | 30 |
| 2. Distribution extravasculaire de l'ASAT et de la GLDH | 32 |
| 3. Courbes de décroissance d'activités enzymatiques après injection intraveineuse d'enzymes | 33 |
| 4. Courbes de décroissance d'activités enzymatiques après induction de lésions hépatiques | 39 |
| DEUXIÈME PARTIE : Objectifs de l'étude | 43 |
| TROISIÈME PARTIE : Étude expérimentale | 45 |
| I. Matériel et méthode | 45 |
| 1. Animaux | 45 |
| i. Description des animaux | |
| ii. Conditions de vie | |
| iii. État de santé | |

| | |
|--|-----------|
| 2. Préparation de la solution enzymatique injectée | 46 |
| i. Origine du foie utilisé | |
| ii. Obtention de la solution | |
| iii. Dosage des activités enzymatiques du surnageant | |
| 3. Injection de la solution enzymatique | 46 |
| 4. Prélèvements | 47 |
| i. Réalisation des prélèvements | |
| ii. Traitement des échantillons | |
| iii. Mesure des activités enzymatiques des échantillons | |
| iv. Vérification de la stabilité nycthémerale | |
| v. Séquence des prélèvements pour la détermination des caractéristiques pharmacocinétiques des enzymes | |
| 5. Méthode d'analyse pharmacocinétique | 48 |
| i. Calcul de l'aire sous la courbe | |
| ii. Clairance plasmatique | |
| iii. Temps moyen de résidence | |
| iv. Volume de distribution | |
| v. Temps de demi-vie plasmatique | |
| vi. Évaluation de la quantité d'enzymes libérées par le foie | |
| vii. Évaluation de la masse lésionnelle à partir du profil plasmatique enzymatique | |
| 6. Méthode d'analyse statistique | 50 |
| | |
| II. Résultats | 51 |
| 1. Stabilité nycthémerale | 51 |
| i. Activité plasmatique de l'ALAT sur 24 heures | |
| ii. Activité plasmatique de l'ASAT sur 24 heures | |
| iii. Activité plasmatique de la LDH sur 24 heures | |
| iv. Activité plasmatique de la GLDH sur 24 heures | |
| 2. Activités enzymatiques dans le foie et le surnageant | 53 |
| i. Activités enzymatiques dans le foie utilisé pour obtenir la solution enzymatique | |
| ii. Activités enzymatiques dans la solution injectée | |
| 3. Profil plasmatique de l'ALAT | 55 |
| 4. Profil plasmatique de l'ASAT | 56 |
| 5. Profil plasmatique de la GLDH | 57 |
| 6. Profil plasmatique de la LDH | 58 |
| 7. Comparatif | 59 |
| | |
| III. Analyse des résultats : calcul des paramètres pharmacocinétiques | 60 |
| 1. Stabilité nycthémerale | 60 |
| 2. Paramètres pharmacocinétiques de l'ALAT | 60 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Paramètres pharmacocinétiques de l'ASAT | 61 |
| 4. Paramètres pharmacocinétiques de la GLDH | 61 |
| 5. Paramètres pharmacocinétiques de la LDH | 62 |
| 6. Synthèse | 63 |
| IV. Discussion | 64 |
| 1. Stabilité nycthémérale | 64 |
| 2. Protocole expérimental | 64 |
| i. Nature de la solution injectée | |
| ii. Nature des échantillons | |
| iii. Critiques du protocole expérimental | |
| - Cas de la phosphatase alcaline | |
| - Inactivation in vitro – Délai avant congélation | |
| - Linéarité de la cinétique plasmatique des enzymes | |
| - Répétabilité de la cinétique plasmatique des enzymes | |
| 3. Comparaison des résultats avec les études précédemment publiées | 66 |
| i. Activités basales | |
| ii. Temps de demi-vie | |
| iii. Volumes de distribution | |
| iv. Clairance plasmatique | |
| 4. Conséquences et applications permises par la connaissance des paramètres pharmacocinétiques | 70 |
| i. Conséquences pour l'interprétation des mesures d'activité plasmatique en hépatologie clinique | |
| - Volume de distribution à l'équilibre : effet de la déshydratation | |
| - Clairance plasmatique et temps de demi-vie : utilisation des enzymes en pratique quotidienne | |
| - Clairance plasmatique : influence du débit cardiaque | |
| ii. Applications destinées à la recherche en hépatologie : calcul de la masse de foie lésé | |
| 5. Clairance et mécanismes d'élimination | 73 |
| CONCLUSION | 75 |
| ANNEXES | 77 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 83 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS | 89 |

Remerciements

À Monsieur le Professeur Jean-Pierre VINEL,

Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Praticien hospitalier en Hépatogastro-entérologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

À Monsieur le Docteur Olivier DOSSIN,

Maître de conférence à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie Médicale des Équidés et des Carnivores

Qui nous a proposé de participer à ce travail et nous a accompagné dans nos choix professionnels. Pour sa gentillesse et sa disponibilité à notre égard.

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Hervé LEFEBVRE,

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie et Thérapeutique

Pour nous avoir guidé dans ce travail, pour sa disponibilité à notre égard et pour sa participation à notre jury de thèse.

Sincères remerciements.

À Monsieur le Professeur Alain RÉGNIER,

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie Médicale des Équidés et des Carnivores

Pour nous avoir soutenu dans nos démarches professionnelles et pour sa disponibilité à notre égard.

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

À **ma grand-mère**, qui a toujours une pensée pour nous tous, ses *Petits Cocos*.

À **mon grand-père**, pour m'avoir appris que, dans la vie, il faut *se cramponner*.

À **mes parents**, qui m'ont toujours soutenu et me soutiendront toujours.

À **mon père**, qui a su me transmettre sa passion pour l'*Art Vétérinaire*.

À **ma mère**, toujours là pour les autres.

À **mon petit frère**

À **Arno, Patrice et Bruno**, mes amis pour la vie.

À **Brice**, le bourguignon !

À **Franck, Lionel, Anne-Lise et Marlène** : parce qu'on est une *bande de Schtroumpfs* !

À **Paupau, Claudie et Yann**, pour ces deux ans de vie commune à la *Joe-Bar*, désormais vendue (sniff), et pour tout le reste.

À **Ramo, Chtit'Maud, Chacha, Isa, Clément, Séby, Gros et RK** : le groupe 10, forever...

À **Delphine, Marie-Anne, Aurélie, Pauline, Mag, Marc, Thomas, Lolo et Yann** : le groupe neuf, pour toujours aussi !

À **Pascal, Mathieu et Mike**, pour cette année difficile, mais qui en valait la peine.

À **Anaïs et Fanny**, qui m'ont laissé squatter quelques temps *La Pitxuli*, rendez-vous des bons dimanches après-midi, mais pas seulement !

À **Mathieu, mais aussi Julie, Léo, Céline, Romanie, Émilie, Mélissa, Geneviève, Yannick, Alice, Lara, Romain, Hugo et Éric, bref, toute la gang** : pour m'avoir guidé lors de mes débuts québécois et pour les *games* de hockey.

À **Béné, Marjo, Maude, Katia, Vanessa, Laetitia, Anne-Charlotte, Amélie, Émilie et Benjamin** : la délégation française 2007 à St Hyacinthe. Bonne chance à tous pour le futur.

Aux Docteurs Delsoy, Courage et Béaur, pour avoir toujours ouvert en grand les portes de la Clinique de Vichy.

À **Sébastien, Bruno, Julien, Hervé et Clothilde**, pour leur accueil toujours chaleureux à la Clinique de Parme.

À tous ceux que j'oublie, de la promo Laborde ou d'ailleurs, pour qu'ils se reconnaissent et qu'ils ne m'en veuillent pas trop ! Pour qu'on garde contact...

Introduction

Dans la démarche diagnostique d'une affection hépatique chez le chien, en raison d'une symptomatologie parfois fruste, le clinicien a souvent recours à des examens de laboratoire, parmi lesquels le dosage des enzymes hépatiques dans le plasma. Il obtient alors des mesures d'activités enzymatiques plasmatiques à un instant donné, que l'on qualifie dans le langage courant de "concentrations enzymatiques plasmatiques".

Le principe d'interprétation est le suivant : une lésion des hépatocytes entraîne la libération d'enzymes intracellulaires dans le secteur plasmatique, avec une relation supposée entre l'intensité de l'augmentation de l'activité plasmatique des enzymes et la sévérité de la lésion. Mais est-ce toujours vrai ? Quelles sont les erreurs que l'on peut commettre en se fondant sur ce principe ? Comment peut-on améliorer l'utilisation des enzymes comme marqueurs de lésion hépatique chez le chien ?

La connaissance des paramètres pharmacocinétiques de ces enzymes permet de répondre en partie à ces questions, puisqu'elle donne des renseignements sur l'élimination des enzymes et sur leurs comportements dans l'organisme. Le but de ce travail est de déterminer les paramètres cinétiques des enzymes hépatiques chez le chien.

Dans une première partie, bibliographique, les enzymes étudiées sont présentées ainsi que leur choix. L'apport de l'analyse pharmacocinétique lors de l'interprétation des activités enzymatiques comme marqueurs hépatiques est expliqué. Dans une deuxième partie, les objectifs sont précisés. La troisième partie est une étude expérimentale visant à déterminer les paramètres pharmacocinétiques de quatre enzymes hépatiques chez le chien sain.

Première Partie : Synthèse Bibliographique

I. Choix des enzymes étudiées et données disponibles

Dans cette première partie, le choix des 4 enzymes retenues dans le protocole expérimental est brièvement expliqué, puis nous exposons leurs principales caractéristiques.

1. Présentation des enzymes étudiées

i. Transaminases (ALAT et ASAT)

Nous avons choisi d'étudier l'alanine aminotransférase (ALAT - EC 2.6.1.2) et l'aspartate aminotransférase (ASAT - EC 2.6.1.1) car leurs activités plasmatiques augmentent lors de cytolysse hépatique chez le chien [Kaneko, 1997 ; Ettinger, 2005].

Alanine aminotransférase (anciennement TGP – Transaminase Glutamo Pyruvique) et asparagine aminotransférase (anciennement TGO – Transaminase Glutamo Oxaloacétique) peuvent se trouver sous forme d'apoenzyme ou d'holoenzyme liée au pyridoxal phosphate dans le sérum [Kaneko, 1997].

L'ASAT existe sous la forme de deux isoenzymes de 92 kDa, l'une cytosolique (ASAT I) et l'autre mitochondriale (ASAT II). L'ALAT est une enzyme cytosolique [Kaneko, 1997 ; Keller, 1981].

ii. Lactate déshydrogénase (LDH)

La lactate déshydrogénase (LDH – EC 1.1.1.27) a été choisie, bien que n'étant pas spécifique du foie, car elle s'est révélée être présente en grande quantité dans l'homogénat de foie préparé.

La lactate déshydrogénase est un tétramère composé de 4 sous-unités de 35 kDa chacune [Appella, 1961]. Il existe 2 types de sous-unités, H et M, qui se combinent pour donner 5 isoenzymes identifiables par spectrophotométrie [Kaneko, 1997 ; Aguilera, 1989 ; Holbrook, 1975]. Une sixième existe chez l'homme, décrite chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque sévère [Wolf, 1985]. C'est une enzyme cytosolique [Kaneko, 1997].

iii. Glutamate déshydrogénase (GLDH)

La glutamate déshydrogénase (GLDH – EC 1.4.1.3) est spécifique du foie, présente une très faible activité plasmatique basale. Elle est exclusivement mitochondriale. C'est une enzyme complexe, allostérique, formée de 6 sous-unités identiques. Elle a un poids moléculaire de 330 kDa [Lehninger, 1998].

2. Métabolisme des enzymes étudiées

i. Synthèse

Ces enzymes sont synthétisées dans les cellules des organes où elles sont concentrées, selon un schéma de synthèse protéique classique.

Pour l'ALAT et l'ASAT, cette synthèse peut être induite par différents facteurs : des médicaments (glucocorticoïdes, anticonvulsivants), des endocrinopathies (hyperadrenocorticisme), des tumeurs (adénocarcinomes et sarcomes, métastases hépatiques), des états d'hypoxie ou d'hypotension. En général, ces phénomènes d'induction enzymatique se traduisent par une élévation modérée de l'activité enzymatique plasmatique (2 fois à 4 fois la limite supérieure de l'intervalle des valeurs usuelles) [Kaneko, 1997 ; Ettinger, 2005].

À notre connaissance, aucune information n'est disponible au sujet d'éventuelles inductions des LDH et GLDH.

ii. Élimination

- Trajet avant de rejoindre le secteur vasculaire

Lindena *et al.* ont comparé les activités des ALAT, ASAT, LDH et GLDH dans la lymphe thoracique et hépatique avec les activités plasmatiques de ces mêmes enzymes [Lindena, 1986 - II]. Leurs observations - ratios activité enzymatique dans la lymphe / activité enzymatique plasmatique supérieurs à 1 - suggèrent que les enzymes ne se déversent pas directement dans le lit vasculaire, mais sont véhiculées par la lymphe avant de rejoindre la circulation par le canal lymphatique thoracique.

Cependant, il est possible que les enzymes présentes dans la lymphe soient la conséquence de la distribution des enzymes après un passage dans le secteur vasculaire. Pour déterminer cela de manière rigoureuse, il faudrait suivre le devenir d'enzymes radio marquées.

- Perte d'activité catalytique

La perte d'activité d'une enzyme s'explique principalement par un changement de conformation. Ce phénomène est exacerbé dans le plasma, car l'enzyme n'est plus liée à son substrat ou à ses cofacteurs et est ainsi plus exposée aux dégradations [Kaneko, 1997].

- Élimination

La clairance plasmatique des enzymes hépatiques chez le chien est assez peu connue, la majorité des recherches ayant été effectuée chez le rat. Il a été supposé que les autres subissent une protéolyse non spécifique, comme les protéines de la coagulation ou du complément [Kaneko, 1997].

Si le foie et le rein sont responsables de la clairance de la LDH, ce ne sont pas les seuls organes impliqués dans l'élimination de cette enzyme chez le chien car l'hépatectomie,

comme la néphrectomie, sont quasiment sans effet sur sa vitesse d'élimination [Stranjörd, 1959]. À notre connaissance, il n'existe pas d'autre étude renseignant une éventuelle élimination urinaire de la LDH.

Wakim *et al.* ont proposé une intervention du système réticulo-endothélial dans la clairance de la LDH et de l'ASAT chez le chien [Wakim, 1963 - IV]. Cette hypothèse est renforcée par d'autres travaux réalisés chez la souris, où ont été observé simultanément l'infection par le virus de Riley (ce virus affecte le système réticulo-endothélial) et l'augmentation des activités plasmatiques de ces enzymes [Mahy, 1967 ; Mahy, 1964 - I ; Mahy, 1964 - II ; Rowson, 1965 ; Mahy, 1965].

La clairance de la LDH 1 n'implique probablement pas le système réticulo-endothélial, car celle-ci n'est pas affectée par l'infection par le virus de Riley (inhibiteur du système réticulo-endothélial) chez la souris [Mahy, 1967 ; Mahy, 1965 ; Rowson, 1965]. Cette hypothèse est confirmée par le fait que cette isoenzyme n'entre pas en compétition avec les déshydrogénases et kinases éliminées par le système réticulo-endothélial [Smit, 1987].

Grâce à des injections d'enzymes marquées par des éléments radioactifs, De Jong a démontré l'intervention des macrophages du foie (cellules de Küpffer), de la rate et de la moelle osseuse chez le rat dans l'élimination de la LDH 5 [De Jong, 1982] : ceux-ci utilisent des mécanismes d'endocytose, par l'intermédiaire d'un récepteur commun à d'autres déshydrogénases et à des kinases [Smit, 1987]. Il en résulte une compétition possible entre ces différentes enzymes [Bijsterbosch, 1985 ; Smit, 1987].

Une séquence d'acides aminés serait reconnue par les récepteurs des cellules du système réticulo-endothélial : un résidu lysine terminal pour la créatine kinase du chien. Une étude a montré que le clivage de ce résidu par une carboxypeptidase double le temps de demi-vie de la créatine kinase (CK) chez le chien [George, 1984].

Wachsmuth a établi chez la souris que la charge du résidu présent sur l'enzyme est responsable de l'affinité avec le récepteur du macrophage : la LDH 5, éliminée rapidement, possède un résidu terminal chargé négativement, alors que la LDH 1 qui a une demi vie plus longue, est chargée positivement [Wachsmuth, 1978].

Un mécanisme semblable intervient lors de l'élimination de l'ASAT II (mitochondriale) du rat, car sa clairance et son endocytose sont très proches de celles de la LDH. Il semble que le récepteur impliqué est identique [Smit, 1987].

Une autre étude confirme cela chez le rat [Kamimoto, 1985]. Ces derniers rapportent que la clairance de l'ASAT II se fait principalement au niveau du foie, car l'hépatectomie et l'injection de tétrachlorure de carbone (substance hépatotoxique) entraînent une diminution de la clairance de l'enzyme. L'étude *in vitro* montre que l'élimination des deux isoenzymes de l'ASAT au niveau du foie fait intervenir uniquement les cellules sinusoidales.

Cette équipe a aussi démontré l'existence d'une endocytose active et souligné des différences dans l'élimination des deux isoenzymes de l'ASAT (la vitesse d'élimination de l'ASAT II est 5 fois plus importante que celle de l'ASAT I). Ce mécanisme d'endocytose est classique : liaison membranaire, internalisation et digestion dans les lysosomes. Les différences existant entre les 2 isoenzymes de l'ASAT pourraient être dues à des affinités plus ou moins importantes avec le récepteur membranaire [Horiuchi, 1985].

Fleisher et Wakim ont démontré chez le chien que les 2 isoenzymes de l'ASAT et l'ALAT ne sont pas filtrées par le rein, car elles se retrouvent en quantité négligeable dans l'urine [Fleisher, 1963 - I ; Wakim, 1963 - II ; Fleisher, 1963 - III].

L'ALAT n'est pas éliminée par le système réticulo-endothélial : comme pour la LDH 1, l'infection par le virus de Riley chez la souris est sans effet sur sa vitesse d'élimination et elle

n'est pas en compétition avec les déshydrogénases et les kinases éliminées par ce mécanisme [Mahy, 1967 ; Mahy, 1965 ; Smit, 1987].

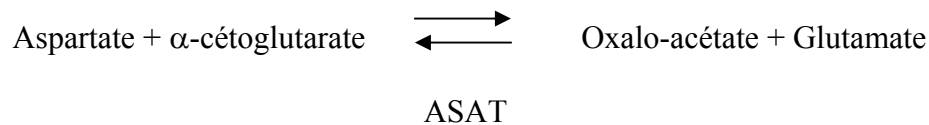
Il n'existe aucune information, à notre connaissance, au sujet de l'élimination de la GLDH, quelle que soit l'espèce considérée.

3. Fonctions des enzymes étudiées

i. Transaminases (ALAT et ASAT)

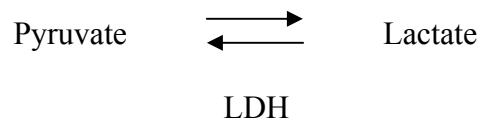
Les transaminases catalysent le transfert d'un groupement α -amine d'un acide aminé (l'alanine pour l'ALAT, l'aspartate pour l'ASAT) sur un groupement α -cétonique de l'acide céto-glutarique, formant ainsi respectivement un acide oxalo-acétique ou un acide pyruvique, plus un acide glutamique.

Elles nécessitent toutes deux le pyridoxal-5'-phosphate comme cofacteur enzymatique.



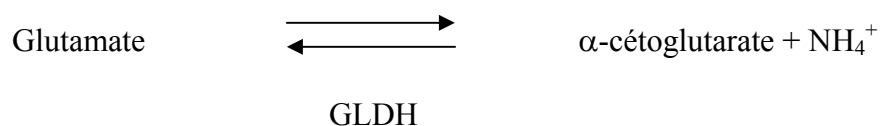
ii. Lactate déshydrogénase (LDH)

La LDH intervient dans l'oxydation réversible de l'acide pyruvique en acide L-lactique. NADH est son cofacteur.



iii. Glutamate déshydrogénase (GLDH)

La GLDH intervient dans les réactions de catabolisme protéique : elle catalyse la transformation du glutamate en α -céto-glutarate et ammoniac, avec NADH comme cofacteur enzymatique.



4. Distributions tissulaires

i. ALAT et GLDH : deux enzymes spécifiques du foie

Des mesures des activités enzymatiques dans de nombreux organes ont montré que l'ALAT et, dans une moindre mesure, la GLDH, sont deux enzymes que l'on retrouve majoritairement dans le foie [Keller, 1981 ; Zinkl, 1971 ; Lindena, 1986 - III]. Elles sont également présentes à des niveaux d'activité nettement inférieurs dans le cœur pour l'ALAT, et dans les reins et la muqueuse intestinale pour la GLDH. Les activités de l'ALAT et de la GLDH et leurs pourcentages d'activités dans les différents organes sont regroupés dans les tableaux 1, 2 et 3. Ces résultats ont été confirmés par analyse immuno-histochimique pour la GLDH [Keller, 1981].

Tableau 1 : Pourcentages d'activité de l'ALAT et de la GLDH dans les tissus du chien, exprimés en pourcentage de l'activité maximale (n=6 – Analyseur Centrifichem) [Keller, 1981]

| TISSU | ALAT | GLDH |
|---------------------|-------------|------------|
| Foie | 100 | 100 |
| Cœur | 19,5 | 9 |
| Rein | 12 | 44 |
| Muscle Psoas | 7,7 | 2 |
| Pancréas | 5,9 | 8 |
| Diaphragme | 5,3 | 3 |
| Colon | 2,7 | 14 |
| Glande sublinguale | 2,4 | 1 |
| Cerveau | 1,9 | 12 |
| Duodénum | 1,7 | 38 |
| Jéjunum | 1,3 | 30 |
| Glande parotide | 1,1 | 3 |
| Glande zygomatique | 1,1 | 4 |
| Iléon | 1,1 | 18 |
| Glande mandibulaire | 0,9 | 2 |
| Rate | 0,9 | 4 |
| Muscle lisse | 0,8 | 8 |

Tableau 2 : Activités des ALAT et GLDH dans les tissus ($\mu\text{mol/g/min}$) et du sérum du chien ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ – les pourcentages de l'activité maximale sont indiqués entre parenthèses - n>4 – DNPH Gilford) [Zinkl, 1971]

| TISSU | ALAT | GLDH |
|-------------------|-----------------------|------------------------|
| Foie | 32 ± 14 (100) | 6,8 ± 2,1 (100) |
| Coeur | 8,7 ± 2,7 (27) | 2,3 ± 0,5 (34) |
| Rein | 2,9 ± 1,7 (9,1) | 5,1 ± 3,9 (78) |
| Diaphragme | 2,5 ± 1,1 (7,8) | 0,6 ± 0,4 (8,8) |
| Muscle | 1,8 ± 0,8 (5,6) | 0,6 ± 0,4 (8,8) |
| Cerveau | 1,5 ± 0,8 (4,7) | 0,5 ± 0,3 (7,4) |
| Pancréas | 1,4 ± 0,9 (4,4) | 0,5 ± 0,1 (7,4) |
| Nœud lymphatique | 0,6 ± 0,1 (1,8) | 0,4 ± 0,3 (5,9) |
| Intestin | 0,4 ± 0,2 (1,3) | 2,0 ± 1,9 (29) |
| Poumons | 0,3 ± 0,1 (1,0) | 0,7 ± 0,6 (10) |
| Rate | 0,2 ± 0,1 (0,6) | 0,5 ± 0,4 (8,8) |
| Érythrocytes | 0,1 ± 0,1 (0,3) | 0,2 ± 0,2 (2,9) |
| Sérum (/ 100 mL) | 3,8 ± 3,8 (12) | 2,6 ± 2,5 (38) |

Tableau 3 : Activités de l'ALAT et de la GLDH dans les tissus du chien (U/g - les pourcentages de l'activité maximale sont indiqués entre parenthèses - n = 20 – Kit Boehringer) [Lindena, 1986 - III]

| TISSU | ALAT | GLDH |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Foie | 94,4 ± 5,4 (100) | 162 ± 7,6 (100) |
| Myocarde | 24,4 ± 1,1 (26) | 17,9 ± 0,81 (11) |
| Rein - Corticale | 10,0 ± 0,74 (11) | 61,8 ± 3,4 (38) |
| Muscle strié | 7,8 ± 0,53 (8,3) | 1,1 ± 0,16 (0,7) |
| Duodénum | 0,7 ± 0,11 (0,7) | 18,2 ± 1,6 (11,2) |
| Poumon | 0,32 ± 0,03 (0,3) | 12,0 ± 0,35 (7,4) |
| Rate | 0,30 ± 0,02 (0,3) | 8,8 ± 0,56 (5,4) |
| Rein – Médulla | 0,26 ± 0,04 (0,3) | 6,6 ± 0,8 (4,1) |

ii. ASAT et LDH : des enzymes plus ubiquitaires

- ASAT

Contrairement à l'ALAT, l'ASAT présente une distribution tissulaire peu spécifique : les tissus dans lesquels elle est retrouvée sont dans l'ordre le cœur, le foie, le muscle et le rein [Keller, 1981 ; Zinkl, 1971 ; Lindena, 1986 - III]. Les pourcentages d'activité et les activités de l'ASAT dans les tissus sont présentés dans les tableaux 4, 5 et 6.

Tableau 4 : Pourcentages d'activité de l'ASAT dans les tissus du chien, exprimés en pourcentage de l'activité maximale (n=6 – Analyseur Centrifichem) [Keller, 1981]

| TISSU | ASAT |
|---------------------|-------------|
| Cœur | 100 |
| Foie | 77,9 |
| Muscle Psoas | 57,4 |
| Diaphragme | 50,5 |
| Rein | 23,1 |
| Cerveau | 18,7 |
| Glande parotide | 9,4 |
| Glande sublinguale | 8,8 |
| Duodénum | 8,6 |
| Muscle lisse | 8,1 |
| Jéjunum | 7,8 |
| Pancréas | 7,4 |
| Iléon | 7,0 |
| Glande mandibulaire | 6,9 |
| Colon | 6,6 |
| Glande zygomatique | 5,1 |
| Rate | 4,2 |

Tableau 5 : Activités de l'ASAT dans les tissus ($\mu\text{mol/g/min}$) et le sérum du chien ($\mu\text{mol}/100 \text{ mL}$ - les pourcentages de l'activité maximale sont donnés entre parenthèses - $n > 4$ – DNPH Gilford) [Zinkl, 1971]

| TISSU | ASAT |
|-------------------|-------------------------------------|
| Cœur | 67 ± 15 (100) |
| Foie | 53 ± 17 (79) |
| Muscle | 46 ± 13 (69) |
| Diaphragme | 42 ± 21 (63) |
| Rein | 24 ± 5 (36) |
| Cerveau | $15,3 \pm 5,8$ (23) |
| Intestin | $12,5 \pm 4,4$ (19) |
| Rate | $7,1 \pm 3,7$ (11) |
| Pancréas | $6,6 \pm 3,7$ (9,9) |
| Poumons | $4,1 \pm 1,8$ (6,1) |
| Nœud lymphatique | $4,0 \pm 1,6$ (6,0) |
| Érythrocytes | $0,2 \pm 0,1$ (0,3) |
| Sérum (/ 100 mL) | $7,0 \pm 4,9$ (10) |

Tableau 6 : Activités de l'ASAT dans les tissus du chien (U/g - les pourcentages de l'activité maximale sont donnés entre parenthèses - $n=20$ – Kit Boehringer) [Lindena, 1986 - III]

| TISSU | ASAT |
|-------------------------|---------------------------------------|
| Myocarde | 235 ± 13 (100) |
| Muscle strié | 142 ± 11 (60) |
| Foie | $91,0 \pm 4,8$ (39) |
| Rein - Corticale | $55,2 \pm 2,7$ (23) |
| Duodénum | $19,5 \pm 0,85$ (8,3) |
| Rein - Médulla | $13,2 \pm 1,5$ (5,6) |
| Rate | $12,6 \pm 0,60$ (5,4) |
| Poumon | $9,8 \pm 0,41$ (4,2) |

Une étude plus ancienne [Nagode, 1966] rapporte, contrairement à toutes les autres, que l'activité maximale d'ASAT se situe dans le muscle, puis dans le foie, le rein et ensuite seulement le myocarde. Ils ont utilisé une méthode de Karmen modifiée pour déterminer les activités enzymatiques dans les tissus de 6 chiens seulement.

Il existe des différences de concentration en ASAT légères, mais significatives, entre les différents lobes du foie chez le chien [Visser, 1981 - I]. Les contenus en ASAT de chacun des lobes du foie du chien sont donnés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Activités enzymatiques de l'ASAT dans les différents lobes du foie (U/g de foie frais) chez le chien (n=10 – Kit Boehringer) [Visser, 1981 - I]

| Lobe hépatique | Activité de l'ASAT |
|-----------------------|---------------------------|
| Lobe droit | 110 |
| Lobe gauche | 115 |
| Lobe carré | 111 |
| Lobe caudé | 111 |
| Moyenne | 112 |

- LDH

La LDH est encore plus ubiquiste que l'ASAT : l'activité totale de la LDH est élevée dans le myocarde, le rein, le muscle squelettique, l'intestin, le foie [Keller, 1981 ; Zinkl, 1971 ; Nagode, 1966 ; Milne, 1987, Lindena, 1986 - III]. Les tableaux 8, 9, 10 et 11 donnent les activités et les pourcentages d'activités de la LDH dans les tissus.

En revanche, chaque tissu présente un patron isoenzymatique unique, et les proportions des 5 isoenzymes dans le sérum indiqueraient, d'après Milne, que le foie est la principale source de LDH sérique chez le chien sain [Milne, 1987].

Tableau 8 : Pourcentages d'activité de la LDH dans les tissus du chien, exprimés en pourcentage de l'activité maximale (n=6 – Analyseur Centrifichem) [Keller, 1981]

| TISSU | LDH |
|---------------------|-------------|
| Cœur | 100 |
| Rein | 97,2 |
| Muscle Psoas | 95,6 |
| Diaphragme | 66,2 |
| Foie | 55,5 |
| Colon | 32,8 |
| Duodénum | 29,9 |
| Cerveau | 28,6 |
| Iléon | 22,8 |
| Jéjunum | 22,4 |
| Rate | 21,0 |
| Glande mandibulaire | 14,5 |
| Pancréas | 13,7 |
| Glande parotide | 12,6 |
| Glande sublinguale | 12,3 |
| Muscle lisse | 11,8 |
| Glande zygomatique | 8,5 |

Tableau 9: Activités de la LDH dans les tissus ($\mu\text{mol/g/min}$) et le sérum du chien ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ - les pourcentages de l'activité maximale sont donnés entre parenthèses - $n>4$ - DNPH Gilford) [Zinkl, 1971]

| TISSU | LDH |
|-------------------|-----------------------|
| Cœur | 320 ± 44 (100) |
| Rein | 256 ± 44 (80) |
| Muscle | 169 ± 83 (53) |
| Diaphragme | 136 ± 55 (43) |
| Foie | 130 ± 18 (41) |
| Rate | 90 ± 34 (28) |
| Nœud lymphatique | 60 ± 32 (19) |
| Cerveau | 58 ± 21 (18) |
| Intestin | 58 ± 24 (18) |
| Pancréas | 52 ± 28 (16) |
| Poumons | 38 ± 11 (12) |
| Érythrocytes | 10 ± 3,9 (3,3) |
| Sérum (/ 100 mL) | 28 ± 19 (8,8) |

Tableau 10: Activités des isoenzymes de la LDH (U/L) et proportions des isoenzymes dans les tissus (% – $n=10$) et le sérum du chien (U/L – $n=8$ - Sigma) [Milne, 1987]

| TISSU | LDH totale | LDH 1 | LDH 2 | LDH 3 | LDH 4 | LDH 5 |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Muscle squelettique | 5953 ± 2273 100 | 439 ± 297 7,9 | 1214 ± 579 20,2 | 814 ± 603 12,7 | 731 ± 380 12,4 | 2754 ± 1165 46,8 |
| Cœur | 3240 ± 1021 100 | 1505 ± 496 46,3 | 1551 ± 505 47,8 | 160 ± 75 5,1 | 13 ± 20 0,4 | 10 ± 11 0,4 |
| Rein | 2127 ± 893 100 | 696 ± 349 32,6 | 259 ± 118 12,5 | 299 ± 160 13,6 | 377 ± 201 17,3 | 495 ± 195 23,9 |
| Intestin | 928 ± 418 100 | 9 ± 11 1,0 | 44 ± 32 4,4 | 231 ± 128 24,0 | 294 ± 131 31,6 | 351 ± 141 39,0 |
| Foie | 909 ± 313 100 | 11 ± 8 1,4 | 19 ± 9 2,3 | 82 ± 36 9,0 | 164 ± 139 16,6 | 633 ± 194 70,7 |
| Poumon | 533 ± 90 100 | 39 ± 17 7,1 | 119 ± 31 22,1 | 174 ± 31 32,7 | 96 ± 28 17,8 | 106 ± 18 20,2 |
| Pancréas | 496 ± 143 100 | 29 ± 14 6,1 | 184 ± 62 36,7 | 205 ± 70 40,9 | 56 ± 24 11,4 | 22 ± 8 4,8 |
| Os | 121 ± 147 100 | 6 ± 8 4,1 | 11 ± 11 8,6 | 15 ± 17 11,9 | 17 ± 21 13,5 | 81 ± 101 61,9 |
| Sérum | 54,3 ± 20,0 100 | 0,5 ± 0,7 1,4 | 1,0 ± 0,6 2,2 | 6,3 ± 4,0 11,9 | 11,0 ± 4,0 20,5 | 35,5 ± 15,0 64,0 |

Tableau 11: Activités de la LDH dans les tissus du chien (U/g – les pourcentages de l'activité maximale sont donnés entre parenthèses - n=20 – Kit Boehringer) [Lindena, 1986 - III]

| TISSU | LDH |
|-------------------------|-----------------------|
| Muscle strié | 516 ± 44 (100) |
| Rein - Corticale | 297 ± 17 (58) |
| Myocarde | 280 ± 16 (54) |
| Foie | 176 ± 8,1 (34) |
| Rate | 79 ± 4,5 (15) |
| Duodénum | 77 ± 4,8 (15) |
| Rein - Médulla | 73 ± 5,3 (14) |
| Poumon | 50 ± 1,9 (9,7) |

5. Répartitions cellulaires dans le foie

L'ALAT et la LDH sont deux enzymes cytosoliques, alors que la GLDH est une enzyme mitochondriale ; l'ASAT est une enzyme mixte, présente à la fois dans la fraction soluble (ASAT I) et dans la fraction mitochondriale (ASAT II) [Keller, 1981]. Le tableau 12 présente la distribution intracellulaire des ALAT, ASAT, LDH et GLDH dans le foie du chien.

Une relation peut être établie entre la localisation intracellulaire des enzymes et la sévérité de la lésion : la libération dans le secteur plasmatique d'une enzyme mitochondriale est associée à une lésion plus grave (nécrose) que s'il s'agit d'une enzyme cytosolique (simple cytolysse).

Tableau 12: Distribution intracellulaire des enzymes dans le foie du chien, en pourcentage d'activité de l'homogénat complet (n=6 – Analyseur Centrifichem) [Keller, 1981]

| | ALAT | LDH | GLDH | ASAT |
|---------------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| Cytosol | 92 | 95 | 9 | 63 |
| Microsome | 2 | - | 3 | 1 |
| Mitochondrie | 5 | 5 | 81 | 35 |
| Noyau et débris | 1 | - | 7 | 1 |

6. Activités sériques et plasmatiques usuelles et facteurs de variation

i. Activités sériques et plasmatiques usuelles

Les valeurs usuelles des activités des enzymes hépatiques dans le plasma et dans le sérum ont été déterminées par plusieurs équipes dont les résultats convergent [Keller, 1981 ; Zinkl, 1971 ; Lindena, 1986 - I ; Milne, 1987 ; Abdelkader, 1986 ; Zimmerman, 1965 ; Badylak, 1982 ; Fleisher, 1956 ; Caisey, 1980]. Ils sont donnés dans les tableaux 13 et 14.

Leurs résultats montrent tous que la GLDH est présente en quantité très faible dans le plasma (quelques U/L), alors que les ALAT et ASAT sont présentes en plus grande quantité (de l'ordre de la dizaine d'U/L). En revanche, des différences importantes existent selon les études pour la LDH, variant de quelques dizaines à quelques milliers d'unités par litre.

Il faut cependant interpréter les différences avec prudence, car les valeurs données sont intrinsèquement liées à la méthode employée pour les déterminer selon les études (effectifs, méthodes de dosage, conservation...).

Tableau 13 : Valeurs usuelles des activités enzymatiques plasmatiques et sériques des ALAT, ASAT, LDH et GLDH chez le chien (U/L)

Les effectifs d'animaux sont indiqués entre parenthèses sous les valeurs quand ils sont disponibles. Les méthodes de dosage sont données sous les références quand elles sont disponibles (* : Karmen Method. ° : Reitman-Frankel Method).

[Keller, 1981 ; Zinkl, 1971 ; Lindena, 1986 - I ; Milne, 1987 ; Abdelkader, 1986 ; Zimmerman, 1965 ; Badylak, 1982 ; Fleisher, 1956 ; Caisey, 1980 ; Kodak, 1991]

| | ALAT | ASAT | LDH | GLDH |
|--|--------------------------------|---------------------------------|---------------------|------------------|
| Activités enzymatiques plasmatiques | | | | |
| [Keller, 1981] Centrifichem | 11 – 34 (154) | 10 – 21 (154) | 17 – 54 (119) | 1 – 6 (156) |
| [Lindena, 1986 - I] Kit Boehringer | 18,3 ± 0,81 (29) | 10,1 ± 0,51 (37) | 25,4 ± 1,23 (49) | < |
| [Kodak, 1991] Vitros | 3 – 50 (46) | 1 – 37 (48) | 105 – 1983 (50) | - |
| Activités enzymatiques sériques | | | | |
| [Zinkl, 1971] DNPH Gilford | 38 ± 38 (> 4) | 70 ± 49 (>4) | 280 ± 190 (>4) | 26 ± 25 (>4) |
| [Abdelkader, 1986] Gemsac | 0 – 69 (25) | 17 – 42 (25) | - | 0 – 9 (25) |
| [Zimmerman, 1965] Zimmerman | 9 ± 2* / 15 ± 3° (24) / (6) | 11 ± 4* / 10 ± 2° (24) / (6) | 38 ± 8 (24) | - |
| [Badylak, 1982] Karmen | 4,0 – 43,4 (nd) | - | - | - |
| [Caisey, 1980] Centrifichem | 60 (10) | 32 (10) | 112 (10) | 3 (10) |

Tableau 14: Valeurs usuelles des activités sériques (U/L) des isoenzymes de la LDH chez le chien (n=8 – Sigma) [Milne, 1987]

| | LDH totale | LDH 1 | LDH 2 | LDH 3 | LDH 4 | LDH 5 |
|---------------------------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Activités enzymatiques sériques (U/L) | 54,3 ± 20,0 | 0,5 ± 0,7 | 1,0 ± 0,6 | 6,3 ± 4,0 | 11,0 ± 4,0 | 35,5 ± 15,0 |

ii. Influence de l'âge

Il ne semble pas y avoir d'effet du jeune âge sur les activités plasmatiques des ALAT, ASAT et GLDH. En revanche, l'activité plasmatique de la LDH est très élevée chez le chiot, puis diminue petit à petit pour atteindre les valeurs usuelles de l'adulte vers 24 mois [Keller, 1981]. Le tableau 15 regroupe les activités enzymatiques plasmatiques des 4 enzymes que nous étudions chez le chien en fonction de l'âge chez le sujet jeune.

Tableau 15: Activités enzymatiques plasmatiques chez le chien en fonction de l'âge (U/L – Analyseur Centrifichem) [Keller, 1981]. Le nombre d'individu représentant chaque catégorie est indiqué entre parenthèses.

| Age | ALAT | ASAT | LDH | GLDH |
|-------------------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| 1 jour (5) | 23,2 ± 1,8 | 21,5 ± 3,0 | 139 ± 24 | 6,2 ± 1,0 |
| 8,2 ± 0,3 semaines (30) | 20,4 ± 1,4 | 17,4 ± 0,4 | 79,8 ± 4,0 | 7,3 ± 0,5 |
| > 7 mois (119 à 155) | 11 - 34 | 10 - 21 | 17 - 54 | 1 - 6 |

Lowseth *et al.* ont montré qu'il existe des différences significatives entre les activités sériques de l'ALAT et de l'ASAT chez le chien de 12 ans et chez le chien de 3 ans. Ils ont également observé que l'activité sérique de la LDH augmente avec l'âge jusqu'à 12 ans, puis diminue légèrement ensuite. Cependant, ils ont estimé que ces différences étaient mineures [Lowseth, 1990].

iii. Influence du sexe

L'étude de l'influence du sexe n'a pas permis de démontrer une différence entre mâles et femelles [Keller, 1981].

iv. Existence de rythmes circadiens chez l'homme

Des variations circadiennes des activités des ALAT, ASAT et LDH ont été montrées chez l'homme [Rivera Coll, 1993]. Dabew *et al.* n'ont pas remarqué de variations significatives des activités sériques des ALAT, ASAT et LDH sur 24 heures chez le lapin et le rat [Dabew, 1976]. Aucune donnée n'est disponible chez le chien, à notre connaissance.

7. Utilité en biochimie clinique

i. Principe de l'utilisation des enzymes en biochimie clinique : test de l'intégrité cellulaire

Le principe général de l'utilisation des enzymes comme marqueurs de cytolysse est le suivant : à l'état physiologique, les cellules hépatiques renferment une grande quantité d'enzymes. Lors de processus pathologiques, la membrane de la cellule en souffrance devient plus perméable aux enzymes, et elles sont alors retrouvées en grande quantité dans le plasma. Il n'est pas nécessaire que la cellule meure pour libérer ses enzymes : une période d'hypoxie peut être suffisante pour perturber la perméabilité membranaire et permettre ainsi le passage des enzymes.

ii. ALAT et GLDH : marqueurs de cytolysse hépatique

En raison de leur grande spécificité pour le foie, l'ALAT et la GLDH peuvent être considérées comme des marqueurs de cytolysse hépatique. Leurs sensibilités pour détecter une affection hépatique quelle qu'elle soit sont respectivement de 70 et 92 % [Abdelkader, 1986], avec des variations selon la nature de l'affection. Celles-ci sont regroupées dans le tableau 16.

Tableau 16 : Sensibilités (pourcentages de cas où les valeurs étaient au dessus de la limite supérieure de l'intervalle de référence) des ALAT, ASAT et GLDH sériques pour détecter une affection hépatique (% - le nombre de chiens présents dans chaque groupe est indiqué entre parenthèses - Gemaec) chez le chien [Abdelkader, 1986]

| | Tumeur hépatique (13) | Hépatite chronique (3) | Cirrhose (5) | Surcharge graisseuse (5) | Autres (7) | Toutes affections (nd) |
|-------------|-----------------------|------------------------|--------------|--------------------------|------------|------------------------|
| ALAT | 69 | 67 | 100 | 60 | 86 | 70 |
| ASAT | 85 | 100 | 80 | 40 | 100 | 81 |
| GLDH | 100 | 100 | 100 | 80 | 86 | 92 |

Les valeurs prédictives sont légèrement différentes dans une autre étude, récapitulée dans le tableau 17, qui est plus récente et s'appuie sur un plus grand nombre d'animaux [Piek, 1996]. De plus, Abdelkader *et al.* n'utilisent pas la définition classique de la sensibilité ($Se = VP/(VP+FN)$) mais le pourcentage de cas où les valeurs sont situées au dessus de la limite supérieure de l'intervalle de référence. Il faut donc interpréter les différences observées avec prudence.

Tableau 17 : Valeurs diagnostiques (%) des ALAT et GLDH pour détecter une affection hépatique chez 186 chiens présentant des signes de maladies hépatiques et 45 témoins, où VPP signifie valeur prédictive positive et VPN valeur prédictive négative [Piek, 1996]

| | Sensibilité | Spécificité | VPP | VPN |
|------|-------------|-------------|------|------|
| ALAT | 92 % | 93 % | 89 % | 95 % |
| GLDH | 73 % | 91 % | 83 % | 85 % |

Une importante libération de GLDH dans le plasma peut être associée à une lésion sévère, car cette enzyme a une localisation exclusivement mitochondriale. De plus, une étude rétrospective montre que l'intensité de l'augmentation d'activité sérique de ces deux enzymes est corrélée au degré de nécrose des cellules du foie [Abdelkader, 1986]. Les moyennes des activités des ALAT et GLDH en fonction du degré de nécrose des cellules hépatiques sont données dans le tableau 18.

Tableau 18 : Moyennes des activités sériques (U/L - Gernsac) des ALAT et GLDH en fonction du degré de nécrose des cellules hépatiques chez le chien [Abdelkader, 1986]
Les moyennes suivies de lettres différentes pour une même enzyme sont significativement différentes. Les effectifs de chaque groupe sont indiqués entre parenthèses.

| Nécrose | Légère (12) | Modérée (9) | Sévère (5) |
|----------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| ALAT | 97 ^x | 203 ^y | 986 ^z |
| GLDH | 15 ^x | 38 ^y | 140 ^z |

iii. ASAT

Contrairement aux précédentes, l'ASAT n'est pas spécifique du foie et ne constitue pas un marqueur de cytolyse hépatique. En revanche, c'est un marqueur sensible (81 %) pour détecter une affection hépatique [Abdelkader, 1986], comme le montre le tableau 16. Le dosage des ASAT peut donc être très utile lors de l'établissement d'un diagnostic d'affection du foie, à condition de s'être assuré au préalable que son augmentation ne provient pas d'un autre organe source (dosage des CK pour écarter une origine musculaire, en particulier). Comazzi *et al.* recommandent de mesurer simultanément les activités sériques de l'ALAT et de l'ASAT afin de coupler leurs sensibilités et leurs spécificités [Comazzi, 2004].

L'ASAT est un marqueur plus sensible que l'ALAT pour détecter des métastases hépatiques [Hammer, 1995]. En général, l'activité de l'ASAT augmente parallèlement à celle de l'ALAT. Si l'ASAT augmente beaucoup plus intensément que l'ALAT, à condition d'écarter une autre origine que le foie (muscle, cœur, rein), la lésion peut être considérée comme sévère car l'ASAT est une enzyme à la fois cytosolique et mitochondriale [Ettinger, 2005].

iv. LDH

Comme l'ASAT, la LDH totale n'est pas une enzyme spécifique du foie. Ses 5 isoenzymes sont néanmoins présentes en proportions différentes selon les tissus : l'analyse de ces proportions par électrophorèse pourrait permettre d'identifier l'organe à l'origine de l'augmentation de l'activité de la LDH dans le plasma [Milne, 1987].

La LDH est cependant moins sensible que les transaminases pour détecter une affection hépatique, et sa spécificité reste faible, même en analysant les patrons isoenzymatiques [Zimmerman, 1979].

II. Pharmacocinétique des enzymes

Cette deuxième partie a pour but de montrer l'intérêt de la détermination des paramètres cinétiques des enzymes hépatiques, en particulier de la clairance plasmatique, lors de l'analyse d'une mesure d'activité enzymatique plasmatique. L'argumentation s'appuie principalement sur les travaux d'Hervé Lefebvre relatifs à la créatine kinase chez la vache [Lefebvre, 1996 ; Lefebvre, 1994].

1. Déterminants de la concentration plasmatique d'un analyte

Une mesure d'activité enzymatique plasmatique à un instant donné, ou plus généralement la concentration plasmatique d'un analyte, est souvent interprétée comme étant le reflet de la quantité d'analyte libéré par l'organe qui le produit.

Cette analyse est approximative car la concentration plasmatique d'un analyte dépend de 3 facteurs, schématisés sur la figure 1 [Lefebvre, 1996] :

- son entrée dans le plasma ;
- son élimination du plasma, c'est-à-dire sa clairance ;
- sa distribution dans l'organisme (quelles proportions de l'enzyme libérée se retrouvent dans le plasma) : son volume de distribution.

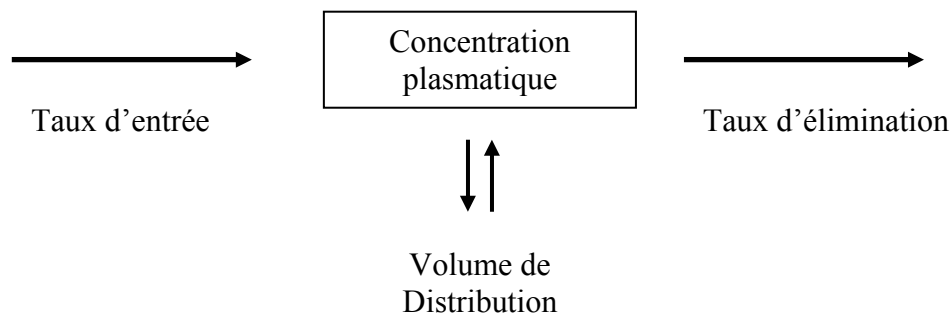


Figure 1. Paramètres influençant la concentration plasmatique d'un analyte [Lefebvre, 1996]

L'approximation concentration dans le plasma = quantité d'analyte libéré par l'organe peut donc être source d'erreurs si l'augmentation de la concentration de l'analyte est due à un facteur de variation autre que la production de l'analyte : diminution de sa clairance plasmatique, par exemple lors d'insuffisance rénale pour un analyte éliminé par le rein, la lipase pancréatique par exemple [Ettinger, 2005].

Une importante déshydratation peut de la même manière entraîner une élévation de la concentration plasmatique si l'analyte a un volume de distribution élevé (et est donc présent en quantité relativement importante dans le secteur extravasculaire).

Il est intéressant de noter que la variation du taux de production d'un analyte peut être le facteur d'erreur quand on évalue indirectement une fonction de clairance à partir d'une concentration plasmatique ponctuelle. Par exemple, la mesure de la créatinine plasmatique peut être élevée sans que la fonction rénale soit affectée en cas de rhabdomyolyse : l'évaluation de la fonction rénale est alors erronée [Kaneko, 1997]. Inversement, une diminution de la production endogène de la créatinine peut masquer une diminution du taux de filtration glomérulaire [Watson, 2002].

2. Intérêts de la connaissance de la cinétique des enzymes hépatiques

i. Intérêts de la connaissance de la clairance pour l'utilisation des marqueurs hépatiques

La connaissance de la clairance plasmatique des enzymes permet de mieux les utiliser comme outils diagnostiques. Par exemple, pour détecter avec une grande sensibilité une lésion hépatique en début d'évolution, il est intéressant de choisir un marqueur à clairance plasmatique faible. En effet, si on choisit un marqueur à clairance élevée, il risque d'avoir déjà été éliminé du plasma et cela peut conduire à des faux-négatifs [Lefebvre, 1994].

Inversement, pour estimer le débit instantané de l'entrée d'un marqueur dans le plasma dans le but de qualifier la progression d'une lésion hépatique aiguë, il peut être intéressant de choisir un marqueur à clairance plasmatique élevée [Toutain, 2000]. La concentration plasmatique du marqueur reflète alors directement la quantité de marqueur entré dans le plasma après libération par le foie, comme c'est le cas pour la myoglobine, rapidement éliminée par le rein, lors d'infarcti expérimentaux du myocarde chez le chien [Klocke, 1982].

La clairance plasmatique des enzymes permet également de déterminer les intervalles entre les analyses à prévoir lorsqu'on désire réaliser un suivi pour appréhender la guérison d'une lésion hépatique. Par exemple, le temps de demi-vie sérique de l'ALAT à l'équilibre est estimé à 2,5 jours chez le chien : dans le cas d'une lésion aiguë, on considère qu'une diminution de 50 % de l'activité sérique de l'ALAT en 2 à 3 jours indique une lésion en train de guérir [Ettinger, 2005].

ii. Intérêts de la connaissance du volume de distribution

Connaître le volume de distribution d'un analyte permet de savoir si sa concentration plasmatique est affectée en cas de déshydratation : un analyte ayant un faible volume de distribution diffuse de manière limitée dans l'espace extracellulaire, et sa concentration plasmatique est donc peu modifiée lors de déshydratation [Toutain, 2004, III].

iii. Intérêts de la connaissance de la biodisponibilité

La connaissance de la biodisponibilité des enzymes hépatiques permet de savoir quelle proportion d'enzymes atteint le secteur vasculaire après sa libération suite à une cytolysse hépatique [Toutain, 2004, IV].

iv. Évaluation de la quantité d'enzymes libérées par l'organe

La connaissance de la clairance et de la biodisponibilité des enzymes permet de connaître la quantité d'enzymes effectivement libérées dans le plasma par l'organe source à partir de mesures d'activités enzymatiques au cours du temps. C'est le principe utilisé par Lefebvre, Ferré, Chanoit et Barros dans leurs études de la CK musculaire respectivement chez la vache, chez le mouton et chez le chien et de la glutathion-S-transférase chez le mouton [Lefebvre, 1996 ; Ferré, 2001 ; Chanoit, 2001 ; Barros, 1996].

v. Évaluation de la masse lésionnelle à partir du profil plasmatique enzymatique

Le principe est exactement le même que pour l'évaluation d'une lésion musculaire par des mesures d'activités plasmatiques de CK [Lefebvre, 1996 ; Lefebvre, 1994 ; Ferré, 2001 ; Chanoit, 2001] : si on connaît la clairance et la concentration du foie en enzymes hépatiques, l'intensité de la lésion peut être évaluée à partir de l'aire sous la courbe d'activité enzymatique en fonction du temps par la relation présentée dans la troisième partie, en présumant que la biodisponibilité des enzymes hépatiques est de 100 %. Chez le mouton, il est possible d'évaluer de manière fiable la quantité de muscle détruit après une lésion iatrogène en appliquant cette relation avec la créatine kinase [Ferré, 2001].

Cette application, bien que peu utilisable et d'intérêt limité en clinique, est surtout réservée aux études pharmacologiques lors des tests précédant la mise sur le marché d'un médicament suspect de toxicité hépatique, ou pour comparer plusieurs formulations.

vi. Différence temps de demi-vie / clairance plasmatique

Dans de nombreuses publications, le temps de demi-vie plasmatique est préféré à la clairance plasmatique pour exprimer la vitesse de disparition d'un analyte. Ce sont deux paramètres différents : contrairement à la clairance qui renseigne sur l'élimination de l'analyte, le temps de demi-vie dépend aussi de la distribution de l'analyte [Toutain, 2004 - II]. Le temps de demi-vie plasmatique terminal est le temps nécessaire pour diviser la concentration plasmatique par 2, après atteinte d'un état de pseudo équilibre, et non le temps nécessaire pour que l'organisme élimine la moitié de la dose.

C'est pourquoi le temps de demi-vie est qualifié de paramètre hybride. Deux analytes ayant le même temps de demi-vie peuvent donc avoir une clairance plasmatique très différente. C'est ce qui explique le phénomène de flip-flop (lorsqu'un analyte ayant une clairance plasmatique élevée met longtemps à rejoindre le secteur plasmatique, son temps de demi-vie est grand, malgré sa clairance élevée). Le paramètre qui renseigne le mieux la persistance d'un analyte dans l'organisme est le temps moyen de résidence [Toutain, 2004 - II].

La principale application du temps de demi-vie est la détermination des intervalles entre les administrations de médicaments.

Ainsi, à la lumière des paragraphes précédents, il apparaît que la connaissance des paramètres cinétiques des enzymes hépatiques est indispensable pour mieux appréhender les variations de leurs activités plasmatiques.

III. Données pharmacocinétiques disponibles sur les enzymes étudiées

Les données cinétiques disponibles dans la littérature au sujet des 4 enzymes sont rares, et celles-ci sont le plus souvent limitées à la publication de temps de demi-vie des enzymes ou des courbes obtenues après injection d'un homogénat de foie suivie de mesures sériées d'activités enzymatiques. Les méthodes de calcul sont la plupart du temps non précisées, et les données brutes sont rarement disponibles, ce qui rend les comparaisons difficiles.

Certains auteurs ont publié des mesures sériées d'activité enzymatique chez des animaux ayant reçu une substance connue pour augmenter l'activité plasmatique ou sérique des enzymes hépatiques en provoquant une cytolysse hépatique, comme le tétrachlorure de carbone.

Il est important de noter que la seule méthode satisfaisante pour déterminer les propriétés pharmacocinétiques d'un analyte est la méthode avec injection intraveineuse de l'analyte. En effet, dans le cas des substances induisant une cytolysse, on ne sait pas quand la lésion guérit, et donc à quel moment les enzymes cessent d'être libérées hors des cellules. De telles méthodes sont impossibles à mettre en œuvre chez l'homme pour des raisons éthiques.

1. Temps de demi-vie

Nous n'avons considéré ici que les temps de demi-vie obtenus après injection d'un homogénat de foie, car, comme nous l'avons expliqué, les autres méthodes sont impropres à la détermination des paramètres cinétiques d'un analyte. Les temps de demi-vie publiés ainsi que les méthodes d'obtention sont regroupés dans les tableaux 19 a et b.

Malheureusement, les méthodes de calculs pharmacocinétiques sont absentes des publications. Il est fort probable que ces temps de demi-vie ont été déterminés par des méthodes graphiques, ce qui est très imprécis. De plus, il semble que certains auteurs les ont mesurés avant atteinte de l'état d'équilibre, car leurs mesures d'activités enzymatiques s'arrêtent avant que cet état ne soit atteint.

Il est donc difficile de comparer ces résultats les uns avec les autres. Il sera également difficile de les confronter à nos résultats.

Tableau 19 a : Temps de demi-vie (min) après injection d'un homogénat de foie chez le chien
 [Zinkl, 1971 ; Fleisher, 1956 ; Fleisher 1963 ; Wakim, 1963 ; Fleisher, 1963 ; Reichard, 1959 ; Stranjörd, 1959 ; Ettinger, 2005]

| Temps de demi-vie | LDH | ALAT | ASAT | GLDH |
|---------------------------|------------|-------------|------------------------------|-------------|
| [Zinkl, 1971] | 105 | 149 | 263 | 475 |
| [Fleisher, 1956] | - | - | 720 | - |
| [Fleisher et Wakim, 1963] | - | 3660 | 708 (ASAT I) 54 (ASAT II) | - |
| [Stranjörd, 1959] | < 360 | - | - | - |
| [Reichard, 1959] | - | 1200 | - | - |

Tableau 19 b : Méthodes d'obtention des temps de demi-vie des enzymes hépatiques chez le chien (ND : non disponible) [Zinkl, 1971 ; Fleisher, 1956 ; Fleisher 1963 ; Wakim, 1963 ; Fleisher, 1963 ; Reichard, 1959 ; Stranjörd, 1959]

| Publications | Protocole expérimental | Dose | Nombre d'animaux | Méthode de dosage | Méthode de calcul PK |
|---------------------------|--|---|---|------------------------------|-----------------------------|
| [Zinkl, 1971] | Injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie | ND | 3 | DNPH | ND |
| [Fleisher, 1956] | Injection IV d'enzymes purifiées et séparées | 0,5 mL/kg | 2 | Karmen | ND |
| [Fleisher et Wakim, 1963] | Injection IV d'enzymes purifiées et séparées | ND | 5 (ALAT) 12 (ASAT I) 16 (ASAT II) | DNPH (ALAT) Karmen (ASAT) | Analyse compartiment. |
| [Stranjörd, 1959] | Injection de LDH (cœur de lapin) dans les veines porte ou cave | 0,1 à 0,2 mL/kg de solution | ND | Hill et Lévi modifiée | ND |
| [Reichard, 1959] | Injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie | 2 mL de solution à 700 µM C ¹⁴ O ₂ par mL d'OCT | 3 | Reitman et Frankel / Karmen | ND |

Certaines publications se contredisent. Ainsi, selon Zinkl (injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie), on peut les classer en 2 catégories [Zinkl, 1971] :

- enzymes ayant un temps de demi-vie bref : ALAT et LDH ;
- enzymes ayant un temps de demi-vie plus long : ASAT et GLDH.

En revanche, Fleisher & Wakim [Fleisher, 1956 ; Fleisher, 1963 – I ; Wakim, 1963 – II ; Fleisher, 1963 - III] ont montré après injection intraveineuse de transaminases purifiées que les ASAT sont éliminées rapidement (ASAT 1 en 3 jours), voire très rapidement (ASAT 2 en 6 heures), alors que l'ALAT disparaît beaucoup plus lentement (15 jours).

Les mêmes ordres de grandeur sont rapportés par Ettinger, mais les sources ne sont pas citées [Ettinger, 2005].

2. Distribution extravasculaire de l'ASAT et de la LDH

Lindena *et al.* ont publié des pourcentages d'activités enzymatiques dans l'espace extravasculaire par rapport à l'activité enzymatique de l'espace intravasculaire pour l'ASAT et la LDH, dans le but de renseigner leurs distributions extravasculaires [Bär, 1972 ; Visser, 1981 – II ; Lindena, 1986 - V]. Les résultats de leurs travaux sont présentés dans le tableau 20.

Tableau 20 : Distributions de l'ASAT et de la LDH (moyennes et intervalle) dans l'espace extravasculaire chez le chien, exprimées en pourcentage de la distribution intravasculaire (plasmatique) [Lindena, 1986 - V], d'après [Bär, 1972 ; Visser, 1981 - II]

| | ASAT | LDH |
|---------------------|-------------|-----|
| [Bär, 1972] | - | 300 |
| [Visser, 1981 - II] | 63 (31-160) | - |

Ces valeurs ont été obtenues après injection d'enzymes exogènes ou infarcti myocardiques. L'auteur de l'article de revue qui les rapporte estime que les enzymes d'importance diagnostique se distribuent majoritairement dans le secteur extravasculaire dans un volume qui est deux fois le volume plasmatique [Lindena, 1986 - V].

3. Courbes de décroissance d'activités enzymatiques après injection intraveineuse d'enzymes

Les auteurs ayant publié des temps de demi-vie ont, pour la plupart, également effectué des courbes de décroissance d'activités enzymatiques. Nous n'avons donc pas répété les protocoles expérimentaux quand ceux-ci sont déjà présentés dans le tableau 19 b.

Fleisher et Wakim ont publié des courbes de décroissance d'activités des transaminases après injection d'enzymes purifiées et séparées dans plusieurs études concordantes. Les courbes qu'ils ont obtenues pour l'ALAT et l'ASAT sont présentées figures 2, 3, 4, 5 et 6 [Fleisher, 1956 ; Fleisher, 1961 ; Fleisher, 1963 – I ; Wakim, 1963 – II ; Fleisher, 1963 - III].

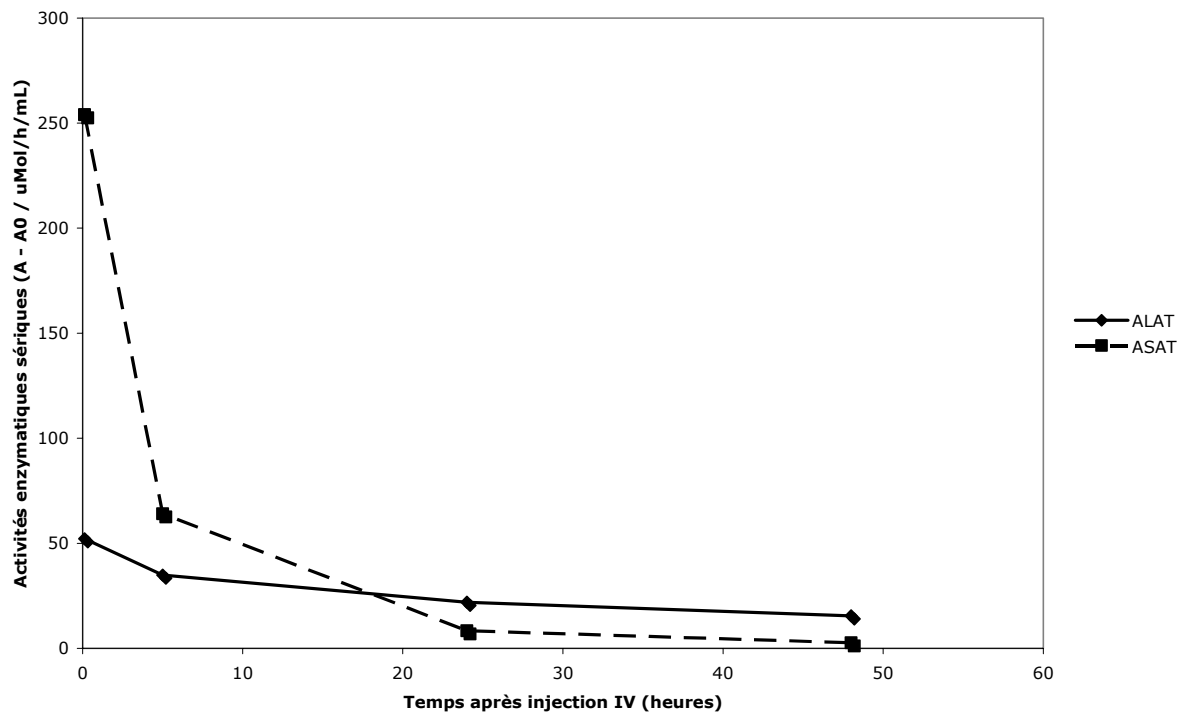


Figure 2 : Activités sériques des transaminases après injection intraveineuse d'enzymes purifiées et séparées chez un chien [Fleisher, 1956]

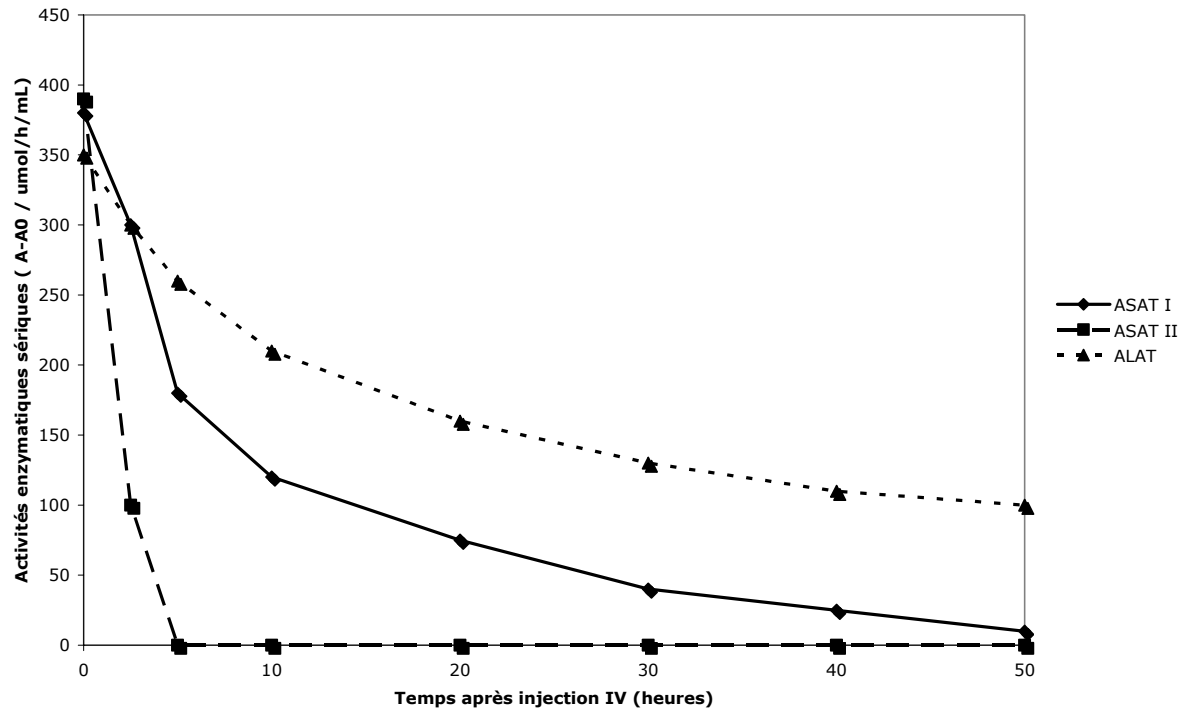


Figure 3 : Activités sériques des transaminases après injection intraveineuse d'enzymes séparées et purifiées chez 3 chiens [Fleisher, 1961]

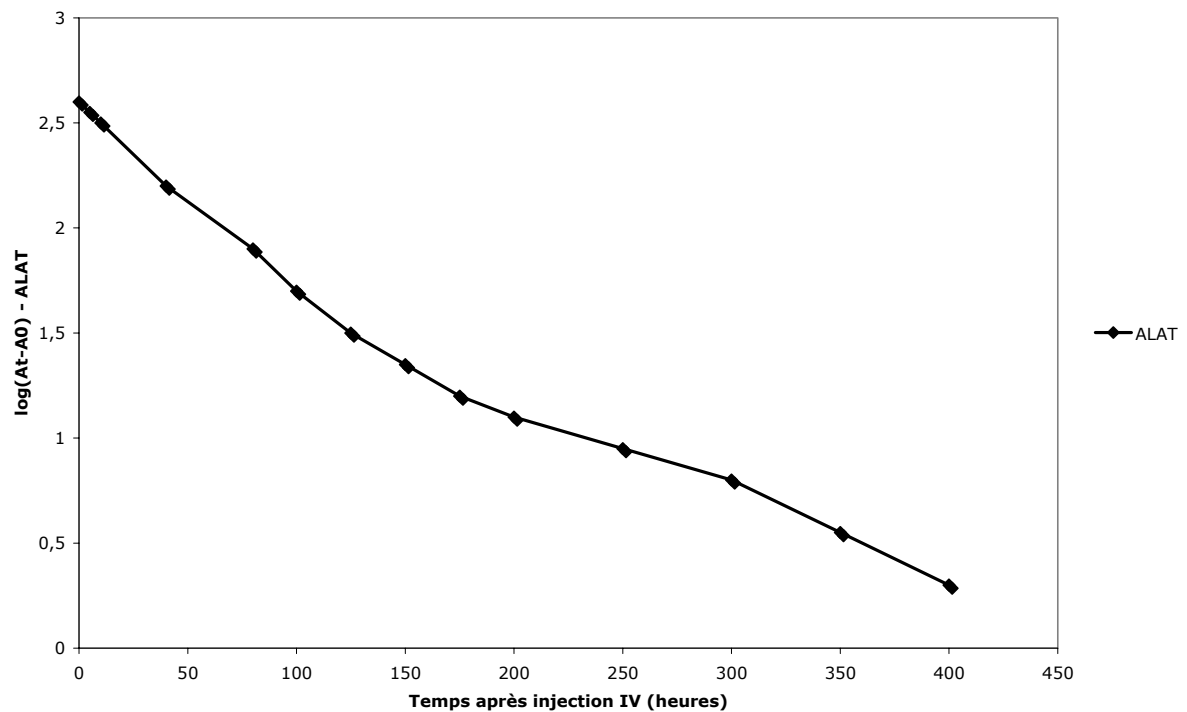


Figure 4 : Activités sériques de l'ALAT après injection intraveineuse d'ALAT séparée et purifiée chez un chien [Fleisher, 1963 - I]

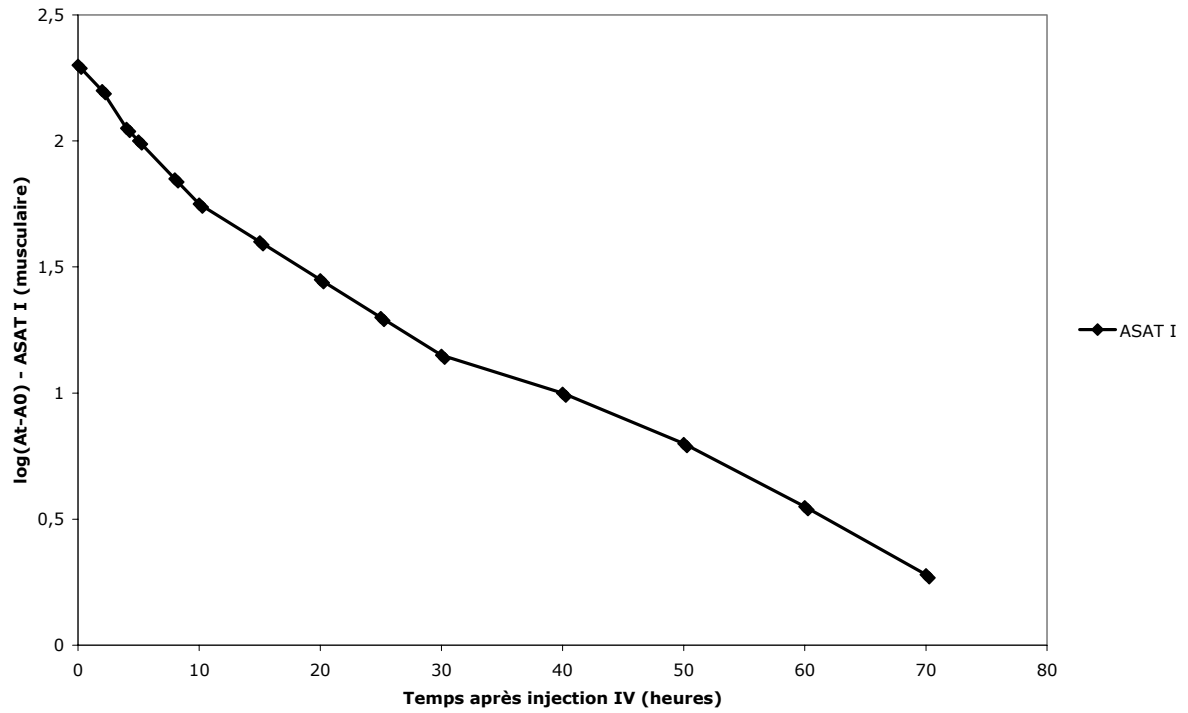


Figure 5 : Activités sériques de l'ASAT I après injection intraveineuse d'ASAT I séparée et purifiée chez un chien [Wakim, 1963 - II]

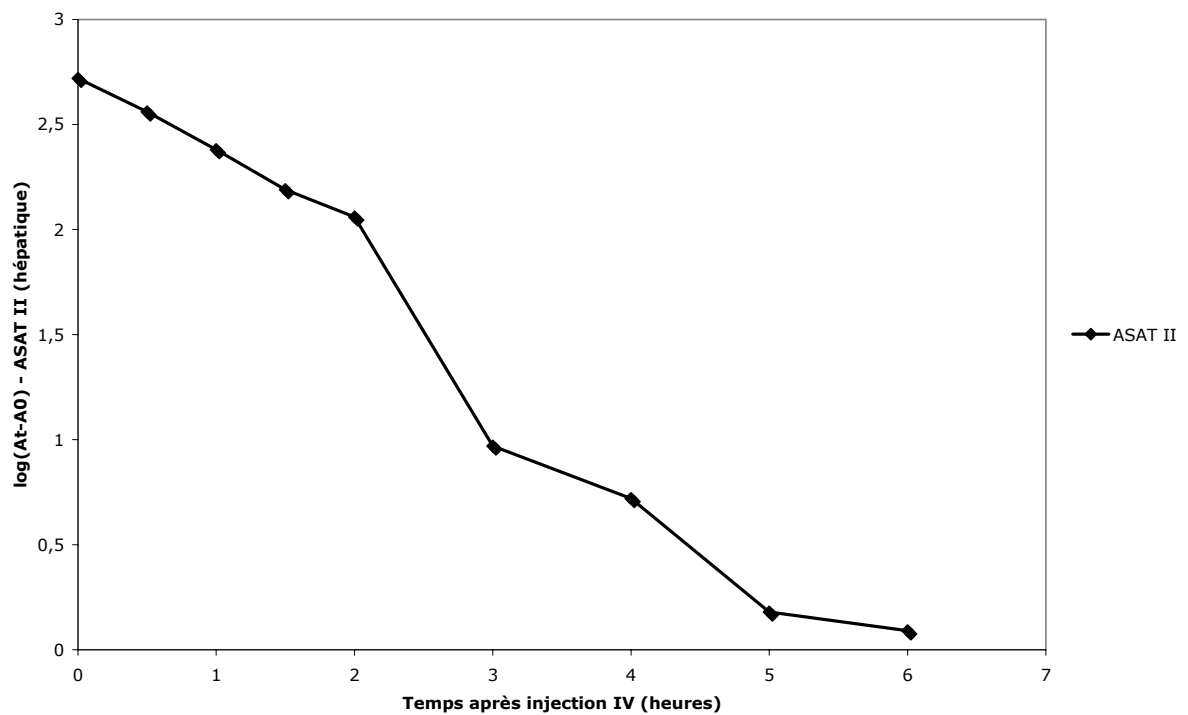


Figure 6 : Activités sériques de l'ASAT II après injection intraveineuse d'ASAT II séparée et purifiée chez un chien [Fleisher, 1963 - III]

Les courbes d'activités enzymatiques sériques en fonction du temps obtenues après injection intraveineuse d'un homogénat de foie par Reichard [Reichard, 1959] sont données figure 7. On peut également constater que l'ASAT est éliminée beaucoup plus rapidement que l'ALAT.

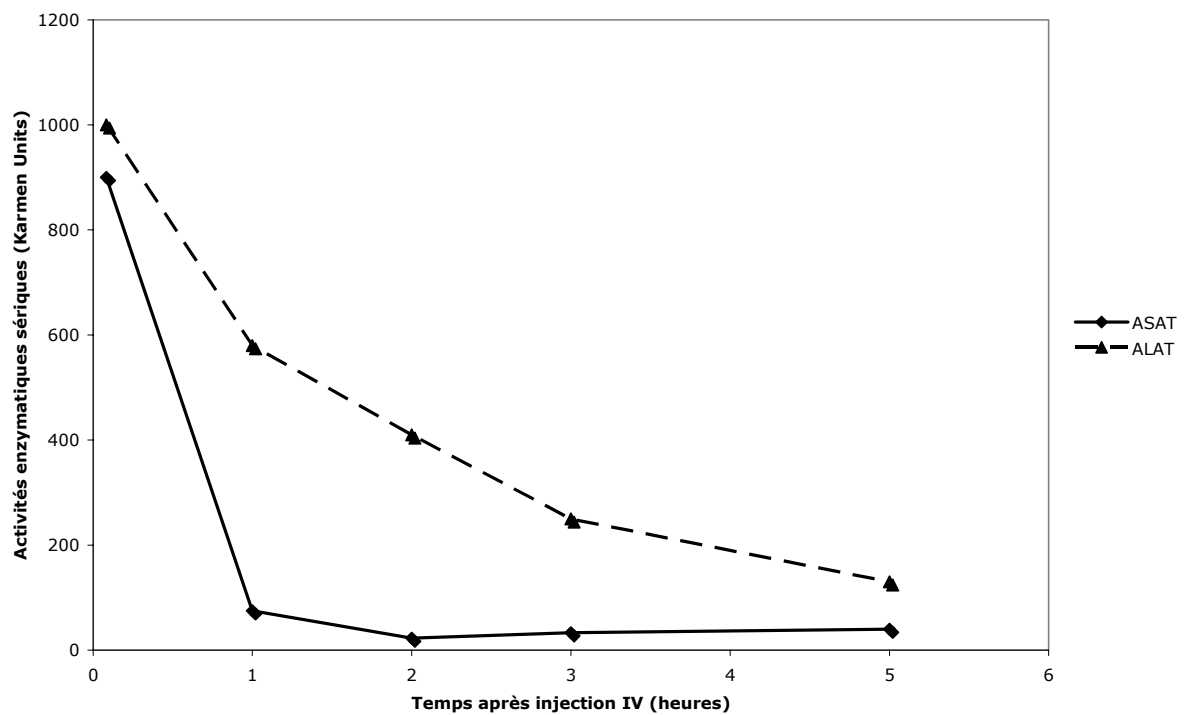


Figure 7: Activités sériques des transaminases après injection intraveineuse d'un homogénat de foie chez un chien [Reichard, 1959]

La figure 8 représente la courbe d'activité de l'ASAT après injection intraveineuse d'un homogénat de foie obtenue par Dunn et col. [Dunn, 1958]. On peut évaluer graphiquement le temps de demi-vie de l'ASAT (ASAT I et ASAT II) à 7 heures, ce qui est du même ordre de grandeurs que les études précédentes.

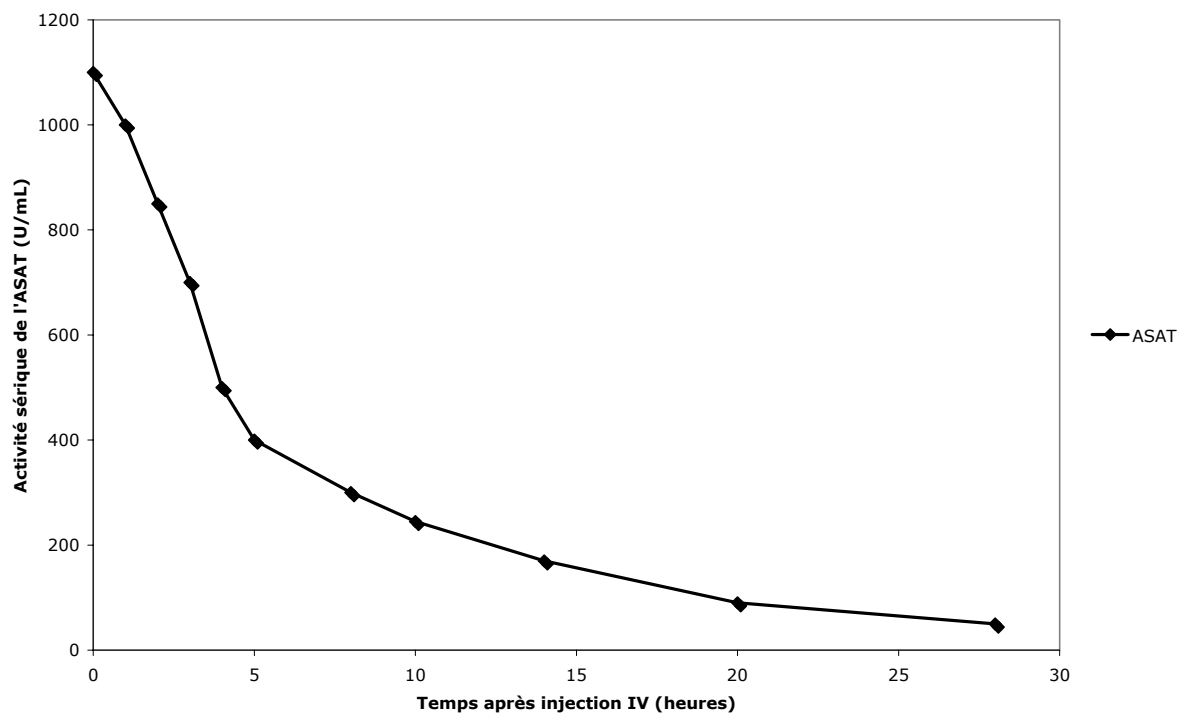


Figure 8 : Activités sériques de l'ASAT après injection intraveineuse d'un homogénat de foie chez un chien [Dunn, 1958]

Stranjörd et col. ont effectué les mêmes travaux pour la LDH [Stranjörd, 1959]. La courbe d'activité qu'ils ont obtenue après injection d'un homogénat de myocarde de lapin dans la veine porte ou dans la veine cave d'un chien est donnée figure 9.

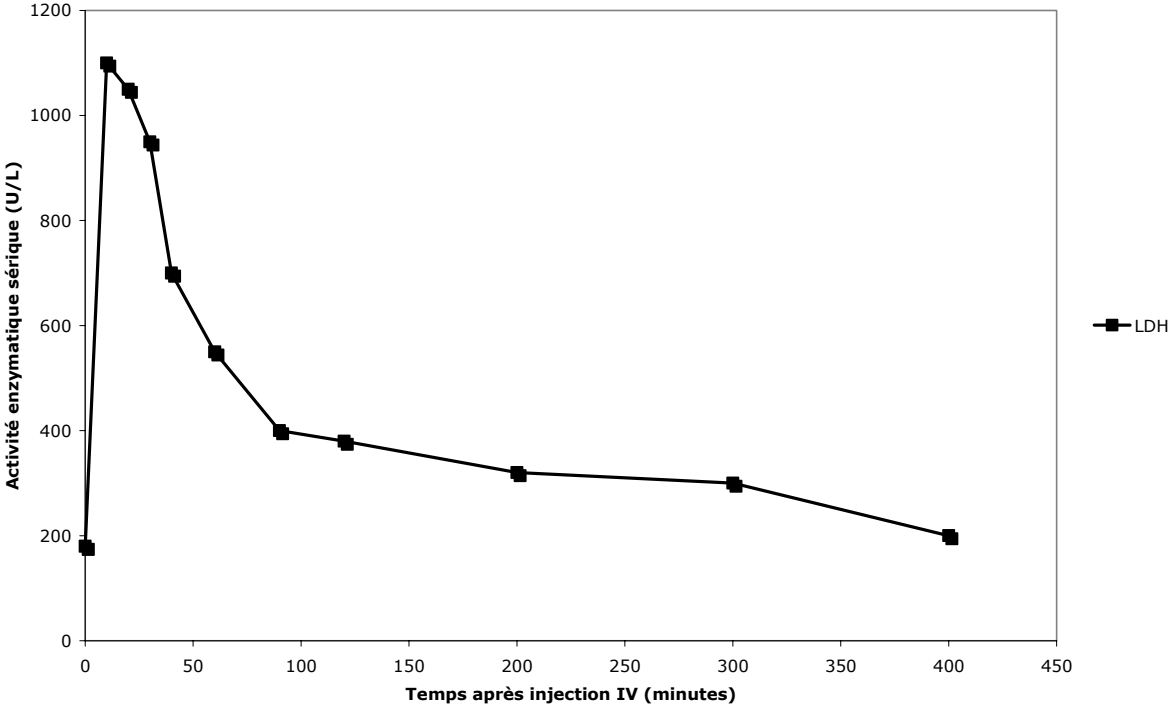


Figure 9 : Activités sériques de la LDH après injection dans la veine porte ou dans la veine cave d'un homogénat de myocarde de lapin chez un chien [Stranjörd, 1959]

4. Courbes de décroissance d'activités enzymatiques après induction de lésions hépatiques

L'emploi de tétrachlorure de carbone (CCl_4) permet de créer une lésion hépatique à un instant donné, et donc la libération dans le plasma d'enzymes hépatiques. Cette méthode est imparfaite, car il n'est pas certain que la lésion créée soit ponctuelle : dans le cas d'une lésion qui dure plusieurs jours, la détermination de la clairance plasmatique est faussée par l'arrivée continue d'enzymes dans le plasma. Il est impossible de connaître la dose d'enzyme qui entre dans le compartiment vasculaire, et les paramètres cinétiques ne peuvent donc pas être déterminés.

Pour les mêmes raisons, les cinétiques obtenues à l'issue de traitements aux corticoïdes sont de mauvaises méthodes pour étudier la pharmacocinétique des enzymes hépatiques.

En revanche, cette approche permet de comparer les enzymes sur le plan cinétique.

On peut ainsi remarquer sur la figure 10 que le retour au niveau d'activité basale après injection de tétrachlorure de carbone est plus long pour l'ALAT que pour l'ASAT [Fleisher, 1956], ce qui est en conformité avec les données cinétiques du paragraphe précédent.

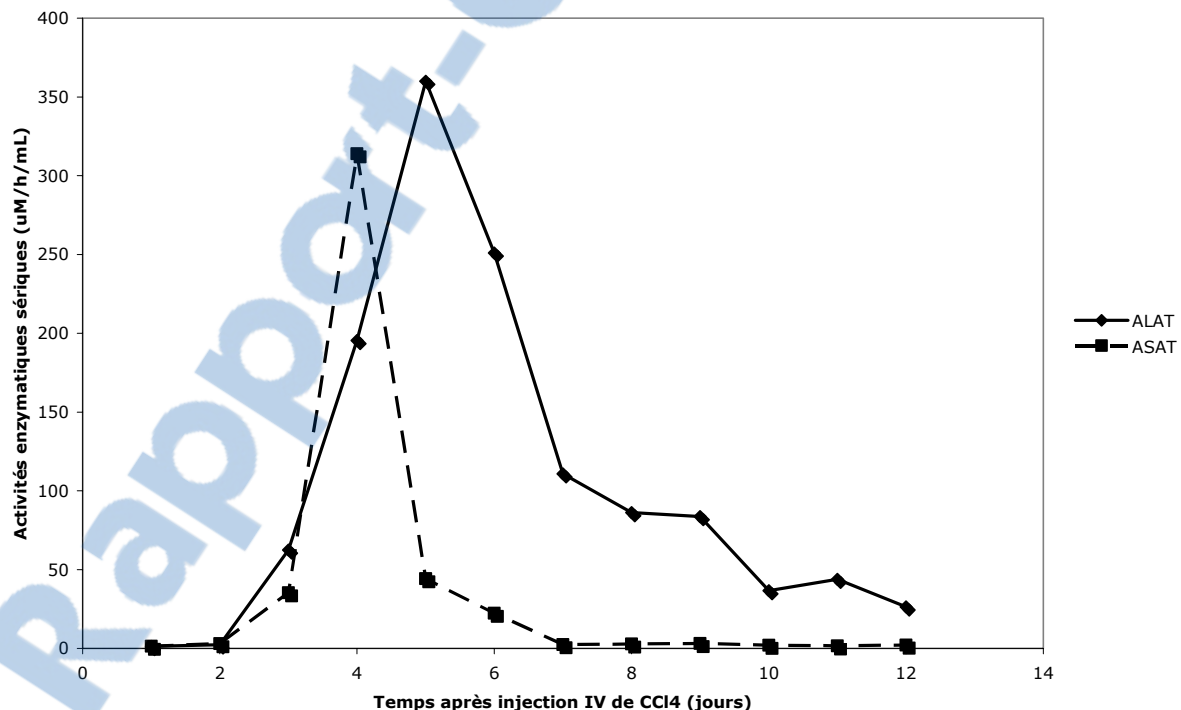


Figure 10 : Activités sériques des ALAT et ASAT après injection IV de CCl_4 chez un chien [Fleisher, 1956]

Fleisher et col. ont également étudié les deux isoenzymes de l'ASAT séparément [Fleisher, 1961]: 48 heures après injection de tétrachlorure de carbone, on observe un pic d'ASAT I, et dans une moindre mesure d'ASAT II. Le retour aux valeurs basales se fait vers le 9^{ème} jour, ce qui est à nouveau en accord avec le paragraphe précédent. Les courbes qu'ils ont obtenues sont données figure 11.

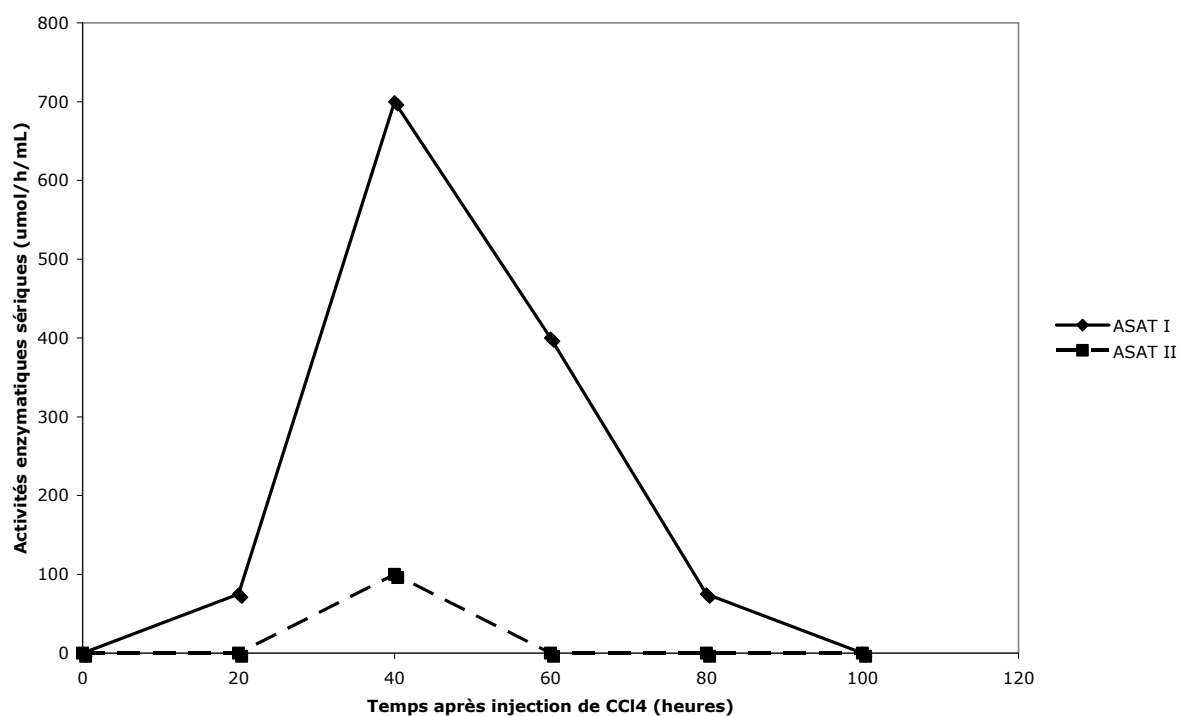


Figure 11: Activités sériques des ASAT après injection IV de CCl₄ chez un chien [Fleisher, 1961]

Reichard a étudié de la même façon la décroissance des activités sériques de l'ALAT et de l'ASAT après injection de tétrachlorure de carbone [Reichard, 1959]. Les courbes d'activités enzymatiques sériques en fonction du temps (figure 12) ont des allures identiques à celles de Fleisher *et al.*

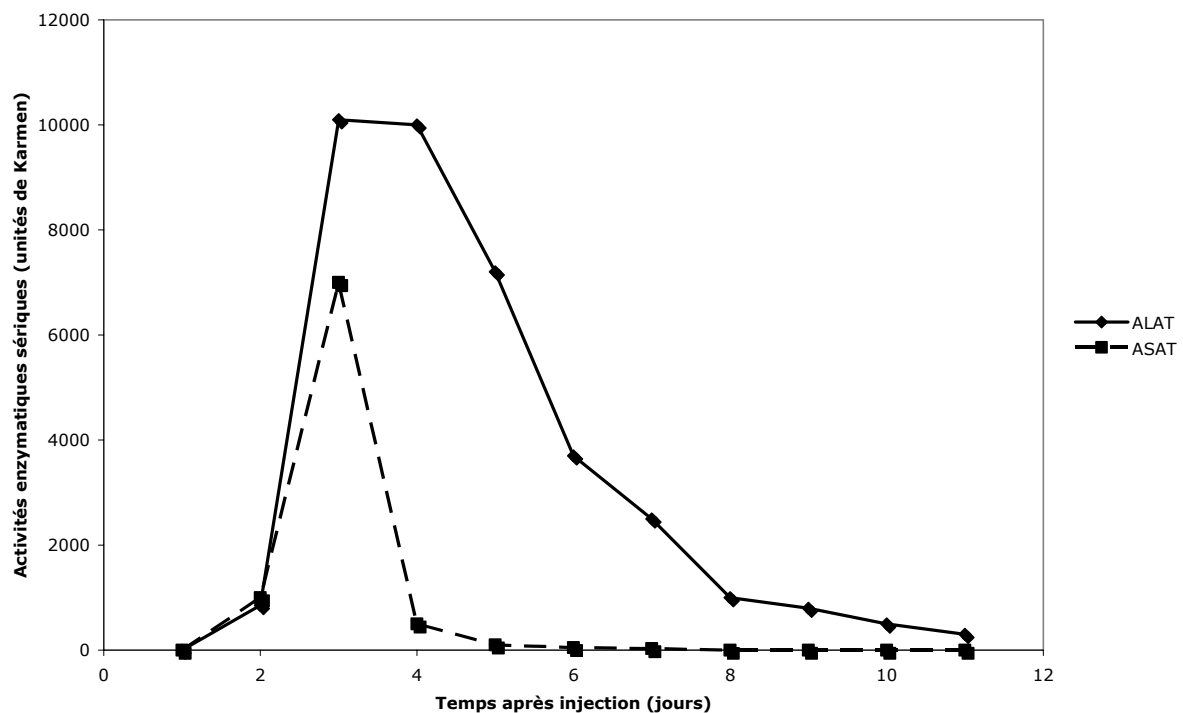


Figure 12 : Activités sériques des ALAT et ASAT après injection IV de CCl_4 [Reichard, 1959]

Ainsi, les données pharmacocinétiques sur les enzymes hépatiques disponibles dans la littérature sont rares, et se limitent presque exclusivement à la publication de temps de demi-vie déterminés selon des méthodes le plus souvent non précisées. Certains paramètres pharmacocinétiques clés comme la clairance plasmatique ou le volume de distribution à l'équilibre ne sont, à notre connaissance, pas documentés. De surcroît, tous les travaux relatifs à ces enzymes sont anciens.

C'est pourquoi, la connaissance de ces paramètres cinétiques étant indispensable pour leur utilisation clinique rigoureuse, il nous est apparu important de chercher à les préciser.

Deuxième Partie : Objectifs de l'étude

Les objectifs de l'étude sont :

- S'assurer de la stabilité des activités plasmatiques des ALAT, ASAT, LDH et GLDH au cours du nyctémère ;
- Déterminer les paramètres pharmacocinétiques de ces 4 enzymes (temps de demi-vie après atteinte de l'état d'équilibre, volume de distribution à l'équilibre, clairance plasmatique) ;
- Proposer une méthode non invasive d'évaluation des lésions hépatiques chez le chien à partir de ces paramètres pharmacocinétiques.

Troisième Partie : Étude expérimentale

I. Matériel et méthode

1. Animaux

i. Description des animaux

Sept chiens de race Beagle (3 femelles et 4 mâles), d'âge moyen $2,88 \text{ ans} \pm 0,49$ [2,46 ; 3,45], et de poids moyens $9,92 \text{ kg} \pm 1,56$ [7,74 ; 12,56] ont été utilisés dans le protocole. Ils étaient correctement entretenus, vaccinés et vermifugés. Le tableau 21 regroupe ces données.

Tableau 21: Caractéristiques des animaux utilisés dans le protocole expérimental

| Chien | Poids (kg) | Tatouage | Date naissance | Sexe |
|----------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------|-------------|
| A | 10,14 | 2DJV 036 | 14/06/03 | M |
| B | 10,54 | 2DJV 033 | 5/06/03 | M |
| C | 10,60 | 2CRL 269 | 29/07/02 | M |
| D | 12,56 | 2CRL 281 | 2/07/02 | M |
| E | 8,76 | 2DJV 054 | 30/06/03 | F |
| F | 9,10 | 2DJV 088 | 18/06/03 | F |
| G | 7,74 | 2CGP 608 | 29/07/02 | F |
| Moyenne | $9,92 \pm 1,56$ | - | - | - |

ii. Conditions de vie

Les chiens vivaient au chenil de l'unité de physiologie de l'ENVN, dans des cages individuelles, en accord avec les lignes directrices d'utilisation et de protection des animaux de laboratoire. Ils étaient sortis quotidiennement et alimentés avec des croquettes physiologiques (Royal Canin M 25 – Royal Canin, Aymargues, France).

iii. État de santé

Un examen clinique complet ainsi qu'une exploration enzymatique du foie ont été réalisés sur chacun des chiens. Aucune anomalie n'a été relevée, à l'exception du chien G, qui semblait présenter une hépatomégalie lors de la palpation abdominale. Cette hépatomégalie a été écartée par une échographie abdominale, et le chien G a donc été inclus dans le protocole.

2. Préparation de la solution enzymatique injectée

La solution enzymatique a été préparée suivant la méthode employée par Lefebvre *et al.* pour mesurer l'activité de la créatine kinase dans les muscles du lapin [Lefebvre, 1993].

i. Origine du foie utilisé

Le foie (Poids = 324 g) provenait d'un jeune chien femelle de 9 mois, de race Bouvier Bernois, euthanasié pour néphropathie congénitale à la clinique pour animaux de compagnie de l'ENVT. Ce chien ne présentait aucun signe clinique ou biologique d'anomalie hépatique (activités plasmatiques des ALAT et PAL dans l'intervalle des valeurs usuelles). Ce foie a été congelé à -20°C pendant 4 semaines.

ii. Obtention de la solution

Le foie a été décongelé à température ambiante, puis coupé en morceaux de 10 grammes environ. Chaque morceau a été broyé à l'aide d'un Potter, et homogénéisé avec du soluté de chlorure de sodium à 9g/L, à raison de 9 volumes de NaCl pour 1 volume de foie. L'ensemble était réfrigéré par de la glace fondante.

Les broyats ont été centrifugés à 15 000 g (MR 1822, Jouan, France) pendant 1 heure à $+4^{\circ}\text{C}$. Le surnageant a été récupéré, puis conservé à -20°C pendant 10 heures (jusqu'au début de l'expérience).

iii. Dosage des activités enzymatiques du surnageant

Les activités des 4 enzymes dans le surnageant ont été déterminées suivant le même protocole que celles des échantillons (voir ci-après).

3. Injection de la solution enzymatique

La solution enzymatique a été injectée à chaque chien au temps T_0 par voie intraveineuse, grâce à un cathéter posé à la veine céphalique gauche. Le cathéter a été posé juste avant injection, et retiré immédiatement après celle-ci.

Le chien F a présenté une réaction (polypnée, tachycardie, abattement intense) au cours de l'administration de la solution enzymatique. Aussi, seuls 9,7 mL des 18,5 mL initialement prévus ont été injectés car l'administration a été stoppée.

4. Prélèvements

i. Réalisation des prélèvements

Les prélèvements ont été effectués aux veines jugulaires droite et gauche, en alternance.

ii. Traitement des échantillons

Les seringues ont été vidées dans des tubes héparinés, en prenant soin de retirer l'aiguille afin de minimiser l'hémolyse. Les tubes ont été immédiatement homogénéisés en les retournant lentement plusieurs fois.

Les tubes ainsi obtenus ont été centrifugés à 1500 g pendant 10 minutes à la température de + 4°C, dans les 30 minutes suivant leur obtention. Le plasma hépariné a été immédiatement pipeté, réparti en aliquotes dans des tubes Eppendorf, et congelé à – 80 °C jusqu'à analyse dans un délai de 10 jours pour les mesures d'activités des ALAT, ASAT et LDH, et dans un délai de 3 mois pour la mesure de l'activité de la GLDH.

iii. Mesure des activités enzymatiques des échantillons

Après décongélation à température ambiante et homogénéisation, les activités des ALAT, ASAT et LDH ont été mesurées par un automate Vitros 250 (Orthoclinical Diagnostics, Rochester, NY, USA), en utilisant le kit fabricant. L'activité de la GLDH a été déterminée par un automate Konelab 20i (Thermoélectron, Cergy Pontoise, France) avec un kit Randox (Randox, Antrim, Royaume-Uni).

Pour chaque enzyme, les mesures d'activités enzymatiques ont été réalisées le même jour et par le même automate pour l'ensemble des chiens. Cinq mesures ont été effectuées pour chaque échantillon.

iv. Vérification de la stabilité nyctémérale

Afin de vérifier l'absence de variations nyctémérales, des prélèvements réguliers ont été effectués sur une période de 24 heures préalablement à l'étude cinétique (temps 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 24 heures). La nourriture avait été retirée 24 heures avant le premier prélèvement. Les animaux ont été nourris après T_{12h}.

v. Séquence des prélèvements pour la détermination des caractéristiques pharmacocinétiques des enzymes

Après injection de la solution enzymatique, des prélèvements sanguins ont été réalisés aux temps 0, 2, 8, 15, 30 minutes, 1, 2, 4, 6, 10 heures et 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 18 jours.

5. Méthode d'analyse pharmacocinétique

La seule méthode rigoureuse permettant de déterminer les paramètres pharmacocinétiques d'un analyte consiste en l'administration de l'analyte par voie intraveineuse, puis en la mesure répétée de la concentration plasmatique de ce dernier jusqu'à ce que cette concentration devienne inférieure à la limite de détection. De plus, une solution enzymatique homologue est préférable à une solution d'enzymes purifiées, d'une part car celles-ci sont moins stables [Friedel, 1979], et d'autre part car ce sont des mélanges d'enzymes homologues qui sont libérées lors d'une lésion, et non des enzymes isolées et purifiées.

Les valeurs d'activités plasmatiques retenues pour l'analyse pharmacocinétique sont celles comprises entre T_0 et la première valeur inférieure ou égale au niveau de base (à T_0). Les résultats ont été analysés selon un modèle non-compartmental, à l'aide du logiciel WinNonLin (Pharsight, Mountain View, CA, USA).

i. Calcul de l'aire sous la courbe

L'aire sous la courbe de la concentration en analyte en fonction du temps (AUC – Area Under the Curve) doit être calculée pour obtenir les paramètres cinétiques de l'analyte. Elle se détermine par une méthode trapézoïdale.

ii. Clairance plasmatique

La clairance plasmatique est donnée par la formule suivante [Lefebvre, 1996 ; Toutain, 2004, I] :

$$Cl = \frac{\text{Dose}}{\text{AUC}}$$

Avec Dose la dose administrée en IV, et AUC l'aire sous la courbe représentant la concentration plasmatique en fonction du temps.

iii. Temps moyen de résidence

Le temps moyen de résidence (MRT – Mean Residence Time) peut être calculé en utilisant la relation suivante :

$$\text{MRT} = \frac{\int t \cdot C \cdot dt}{\int C \cdot dt}$$

Avec t le temps, C la concentration plasmatique de l'analyte considéré et d_t la différentielle de l'élément en fonction du temps.

iv. Volume de distribution

Le volume de distribution après atteinte de l'état d'équilibre (V_{ss} – Steady State Volume of distribution) se calcule à partir des 2 paramètres précédents [Toutain, 2004, III] :

$$V_{ss} = Cl \cdot MRT$$

v. Temps de demi-vie plasmatique

Le temps de demi-vie plasmatique terminal d'un analyte peut être déterminé grâce à la relation suivante [Toutain, 2004, II] :

$$t_{1/2} = \frac{0,632}{\lambda_z}$$

Avec λ_z la pente de la phase d'élimination de la courbe d'activité enzymatique plasmatique en fonction du temps.

vi. Évaluation de la quantité d'enzymes libérées par le foie

À partir de la clairance et de la biodisponibilité d'une enzyme hépatique, on peut calculer la quantité d'enzymes réellement libérées par le foie en mesurant les activités plasmatiques au cours du temps :

À un instant donné, dans des conditions d'équilibre, on a :

$$\text{Total analyte Entré} = \text{Total analyte Éliminé} \quad (1)$$

$$\text{Avec :} \quad \text{Total Entré} = \text{Total analyte libéré} \times F \quad (2)$$

Où F est la biodisponibilité de l'analyte, c'est à dire la proportion d'analyte qui rejoint le secteur plasmatique.

$$\text{Et} \quad \text{Total Sorti} = Cl \times [\text{analyte}]_{\text{moy}} \quad (3)$$

Où Cl est la clairance plasmatique de l'analyte, c'est à dire le débit d'élimination de l'analyte ;

Et $[\text{analyte}]_{\text{moy}}$ est la concentration plasmatique moyenne de l'analyte après la lésion et à l'équilibre.

$$\text{Donc d'après (1) : Total analyte libéré} \times F = Cl \times [\text{analyte}]_{\text{moy}}$$

$$\text{D'où : Total analyte libéré} = \frac{\text{Cl} \times [\text{analyte}]_{\text{moy}}}{F} \quad (4)$$

vii. Évaluation de la masse lésionnelle à partir du profil plasmatique enzymatique

À partir de la clairance (Cl) et de la concentration du foie en enzymes hépatiques ($[\text{enzyme}]_{\text{Foie}}$) l'intensité de la lésion peut être évaluée à partir de l'aire sous la courbe d'activité enzymatique en fonction du temps (AUC) par la relation suivante, en présumant que la biodisponibilité des enzymes hépatiques est de 100 % :

La clairance de l'enzyme est déterminée après administration d'enzyme exogène par l'équation 5 :

$$\text{Cl} = \text{Dose} / \text{AUC} \quad (5)$$

La clairance de l'enzyme endogène étant la même que celle de l'enzyme exogène, l'équation 5 peut s'écrire sous la forme :

$$\text{Quantité libérée} = \text{Cl} \times \text{AUC}$$

(avec l'hypothèse que $F = 100\%$)

$$\text{Or : Quantité libérée} = W_{\text{Foie lésé}} \times [\text{enzyme}]_{\text{Foie}} \quad (6)$$

$$\text{Donc : } W_{\text{Foie lésé}} = \frac{\text{Cl} \times \text{AUC}}{[\text{enzyme}]_{\text{Foie}}} \quad (7)$$

6. Méthode d'analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés sous la forme d'une moyenne \pm écart-type. Les variations d'activités plasmatiques sur 24 heures ont été analysées en recherchant les effets « heure de prélèvement » et « chien » par analyse de variance avec le logiciel Systat 8.0 (SPSS Incorporation, Chicago, ILL, USA).

II. Résultats

Les résultats sont rapportés dans les tableaux suivants, et également représentés graphiquement, enzyme par enzyme. Une courbe présente les 4 enzymes à la même échelle et permet de les comparer.

1. Stabilité nyctémérale

Les résultats de la manipulation visant à vérifier la stabilité nyctémérale de l'activité plasmatique des enzymes sont retranscrits sous forme de tableaux en annexes et de graphiques, enzyme par enzyme dans les pages suivantes.

i. Activité plasmatique de l'ALAT sur une période de 24 heures

Sur une période de 24 heures, l'activité plasmatique de l'ALAT était en moyenne de 28,6 U/L ($\pm 16,1$ U/L). L'annexe 1a donne les valeurs de l'activité plasmatique chien par chien. Les résultats sont également présentés sous la forme d'un graphique (figure 13).

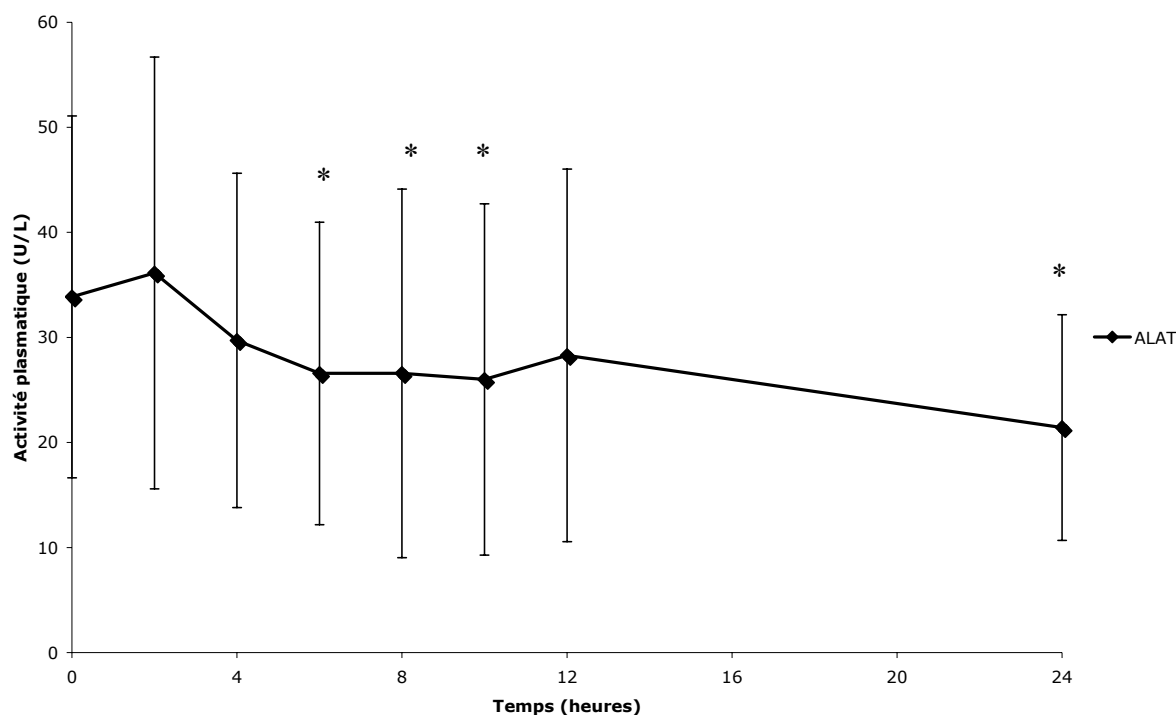


Figure 13 : Activité plasmatique moyenne de l'ALAT (U/L) sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle. Les points notés * sont significativement différents de T₀.

ii. Activité plasmatique de l'ASAT sur une période de 24 heures

La moyenne de l'activité plasmatique de l'ASAT sur 24 heures était de 22,7 U/L ($\pm 4,2$ U/L). Les résultats sont donnés chien par chien dans l'annexe 1b et sur la figure 14.

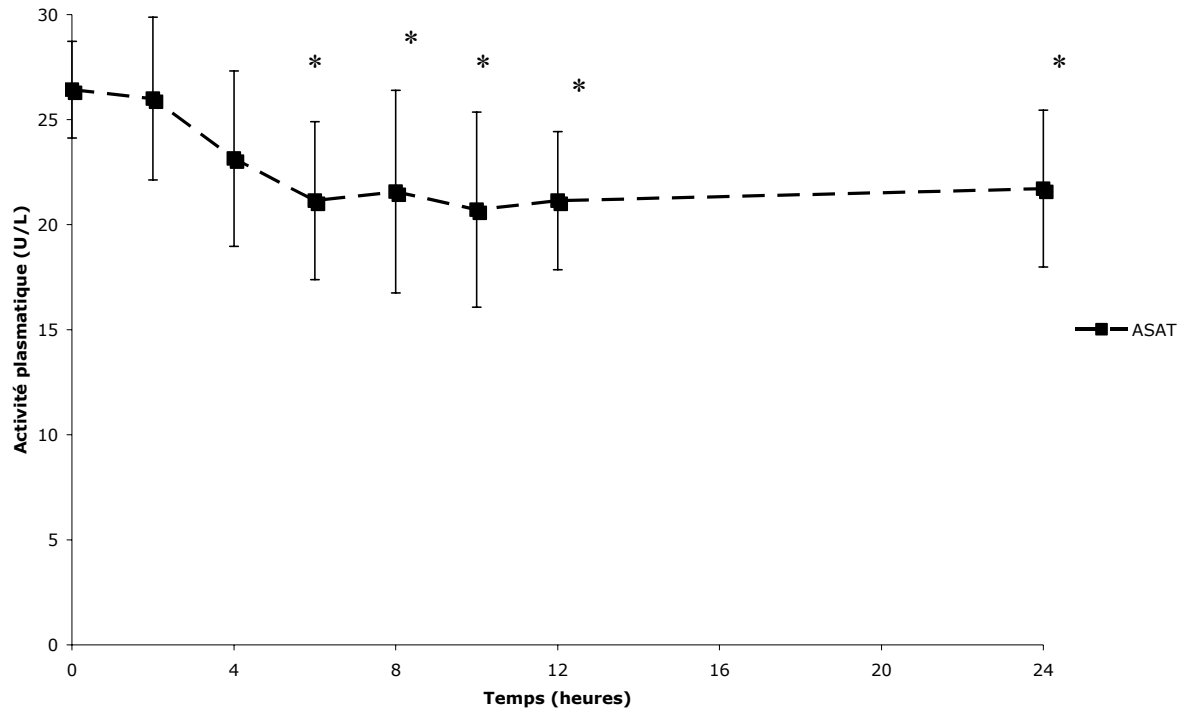


Figure 14 : Activité plasmatique moyenne de l'ASAT (U/L) sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle. Les points notés * sont significativement différents de T₀.

iii. Activité plasmatique de la LDH sur une période de 24 heures

L'activité plasmatique de la LDH étant le plus souvent située en dessous de la limite de détection, il n'a pas été possible de réaliser une courbe de l'activité plasmatique de la LDH sur 24 heures (annexe 2a).

iv. Activité plasmatique de la GLDH sur une période de 24 heures

L'activité plasmatique de la GLDH sur 24 heures était en moyenne de 3,33 U/L ($\pm 0,64$ U/L). L'annexe 2b et la figure 15 présentent les résultats.

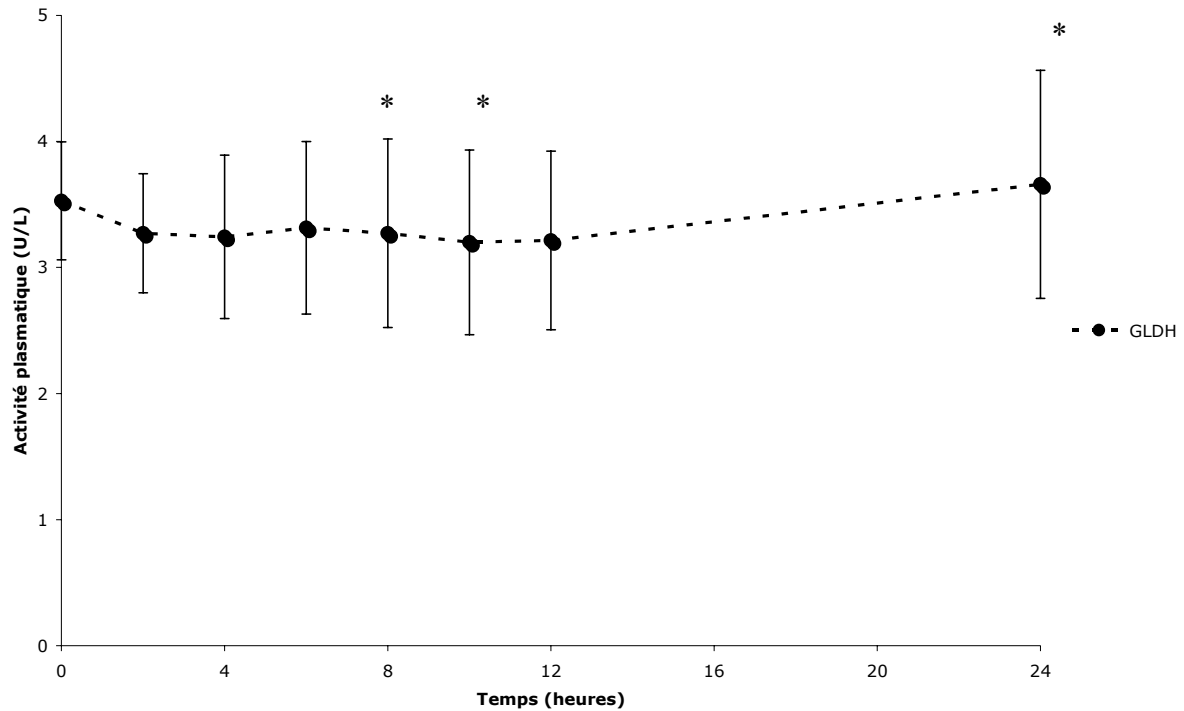


Figure 15: Activité plasmatique moyenne de la GLDH (U/L) sur une période de 24 h chez 7 chiens de race Beagle. Les points notés * sont significativement différents de T_0 .

2. Activités enzymatiques dans le foie et dans le surnageant

i. Activités enzymatiques dans le foie utilisé pour obtenir la solution enzymatique

Les activités enzymatiques des ALAT, ASAT, LDH et GLDH contenues dans le foie utilisé pour obtenir la solution enzymatique sont données dans le tableau 22.

Tableau 22 : Activités enzymatiques du foie utilisé pour obtenir la solution (U/g de foie)

| Activités enzymatiques | ALAT | ASAT | LDH | GLDH |
|-------------------------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| (U/g de foie) | 254,1 | 381,7 | 1083,7 | 93,2 |

ii. Activités enzymatiques dans la solution injectée

Les activités des enzymes dans le surnageant sont données dans le tableau 23.

Tableau 23 : Activités enzymatiques contenues dans la solution injectée (U/L)

| Activités enzymatiques | ALAT | ASAT | LDH | GLDH |
|-------------------------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| (U/L) | 82 336 | 123 683 | 351 122 | 30 197 |

Le volume de solution ainsi que le nombre d'unités par kg sont donnés pour chaque chien dans le tableau 24.

Tableau 24 : Volume de solution enzymatique injectée (mL) et activités enzymatiques rapportées aux poids des animaux (U/kg)

| Chien | Volume (mL) | ALAT (U/kg) | ASAT (U/kg) | LDH (U/kg) | GLDH (U/kg) |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| A | 20 | 244 | 162 | 693 | 60 |
| B | 21,1 | 248 | 165 | 703 | 60 |
| C | 21,2 | 247 | 165 | 702 | 60 |
| D | 25,1 | 247 | 165 | 702 | 60 |
| E | 15,5 | 219 | 146 | 621 | 53 |
| F | 9,7 | 132 | 88 | 374 | 32 |
| G | 15,5 | 248 | 165 | 703 | 60 |
| Moy. ± SD | 18,3 ± 5,1 | 226 ± 43 | 151 ± 29 | 643 ± 122 | 55 ± 10 |

3. Profil plasmatique de l'ALAT

Les activités enzymatiques plasmatiques de l'ALAT des 7 chiens après injection de la solution enzymatique sont données dans l'annexe 3. On peut remarquer que l'activité redescend au niveau basal après environ 15 jours (20000 minutes - figure 16).

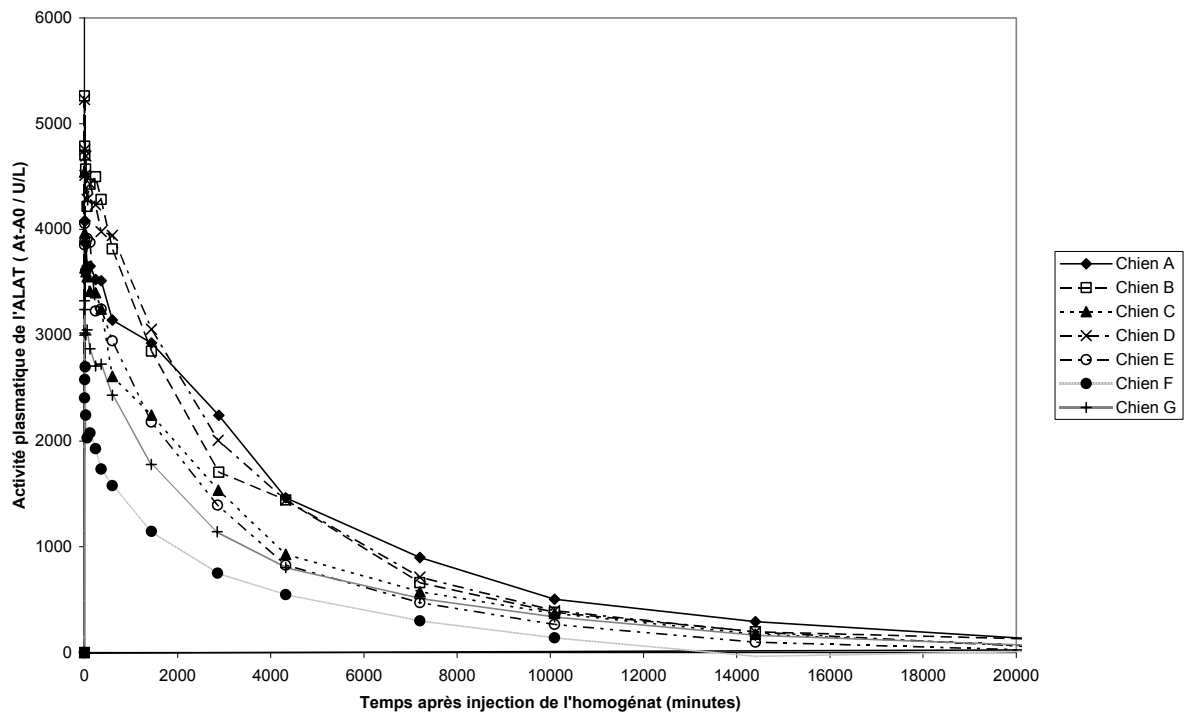


Figure 16 : Profil plasmatique de l'ALAT (U/L) après injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle

4. Profil plasmatique de l'ASAT

L'annexe 4 présente les activités plasmatiques de l'ASAT après injection de la solution enzymatique. L'activité basale est retrouvée dès 7 jours (10000 minutes - figure 17).

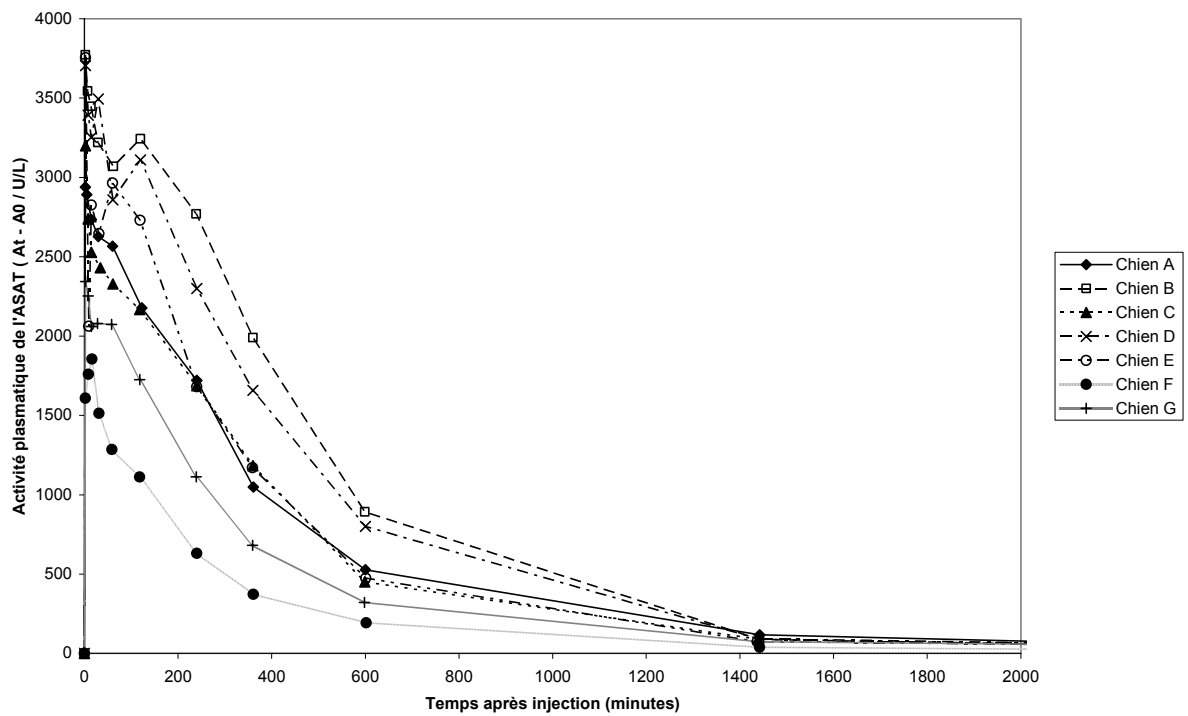


Figure 17 : Profil plasmatique de l'ASAT (U/L) après injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle

5. Profil plasmatique de la GLDH

L'annexe 5 donne les activités plasmatiques de la GLDH après injection de la solution enzymatique pour les 7 chiens. L'activité basale est basse (environ 3 UI/L). Le retour à cette activité basale se fait en 10 jours environ (14000 minutes). Ces données sont présentées graphiquement sur la figure 18.

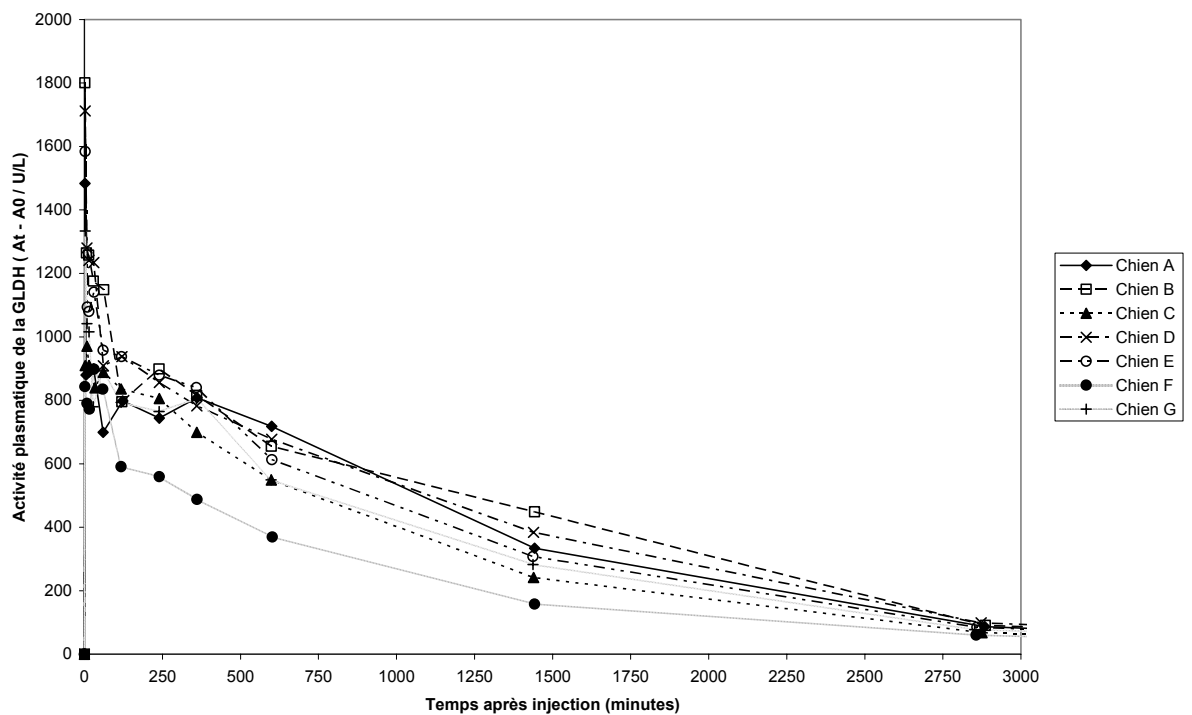


Figure 18 : Profil plasmatique de la GLDH (U/L) après injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle

6. Profil plasmatique de la LDH

Les activités plasmatiques de la LDH après injection de l'homogénat sont rapportées dans l'annexe 6. Le niveau de base est rétabli en 10 heures environ (600 minutes). La figure 19 présente ces activités en fonction du temps.

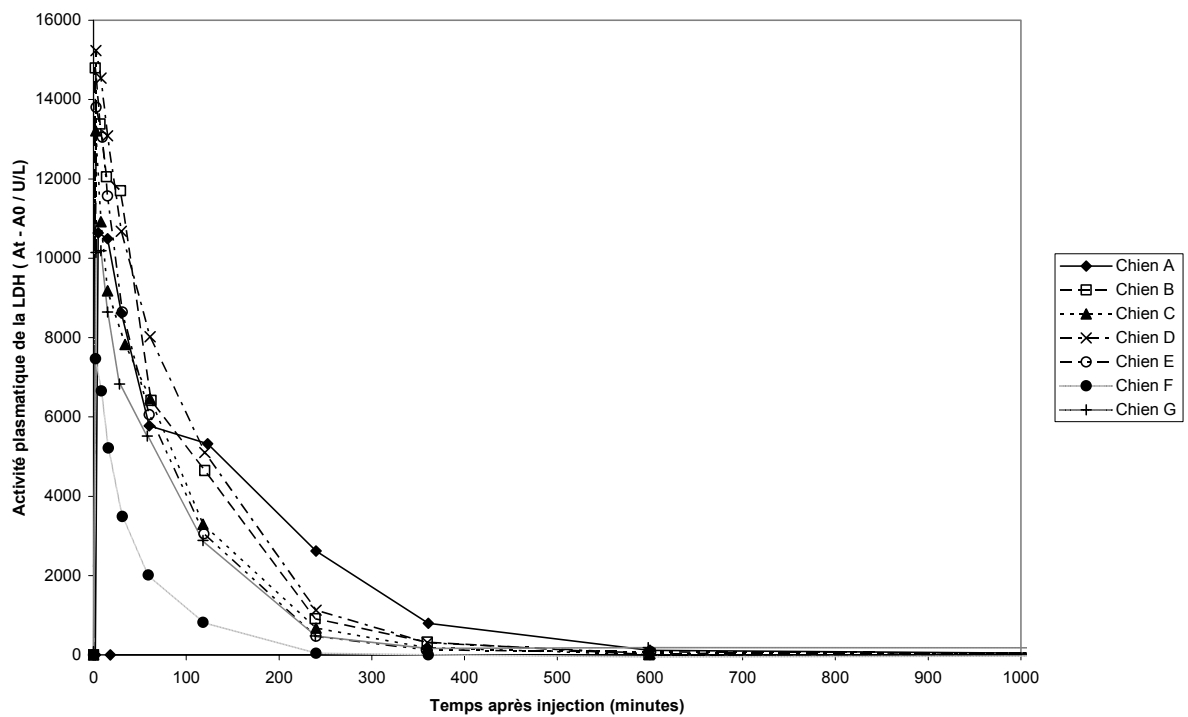


Figure 19 : Profil plasmatique de la LDH (U/L) après injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle

7. Comparatif

La figure 20 représente les courbes de décroissance des 4 enzymes à la même échelle chez le chien 3, considéré comme représentatif des 7 chiens étudiés : l'allure de la courbe est identique pour les 4 enzymes. En revanche, la LDH est éliminée beaucoup plus vite que l'ASAT et la GLDH, et l'ALAT est éliminée plus lentement que les autres.

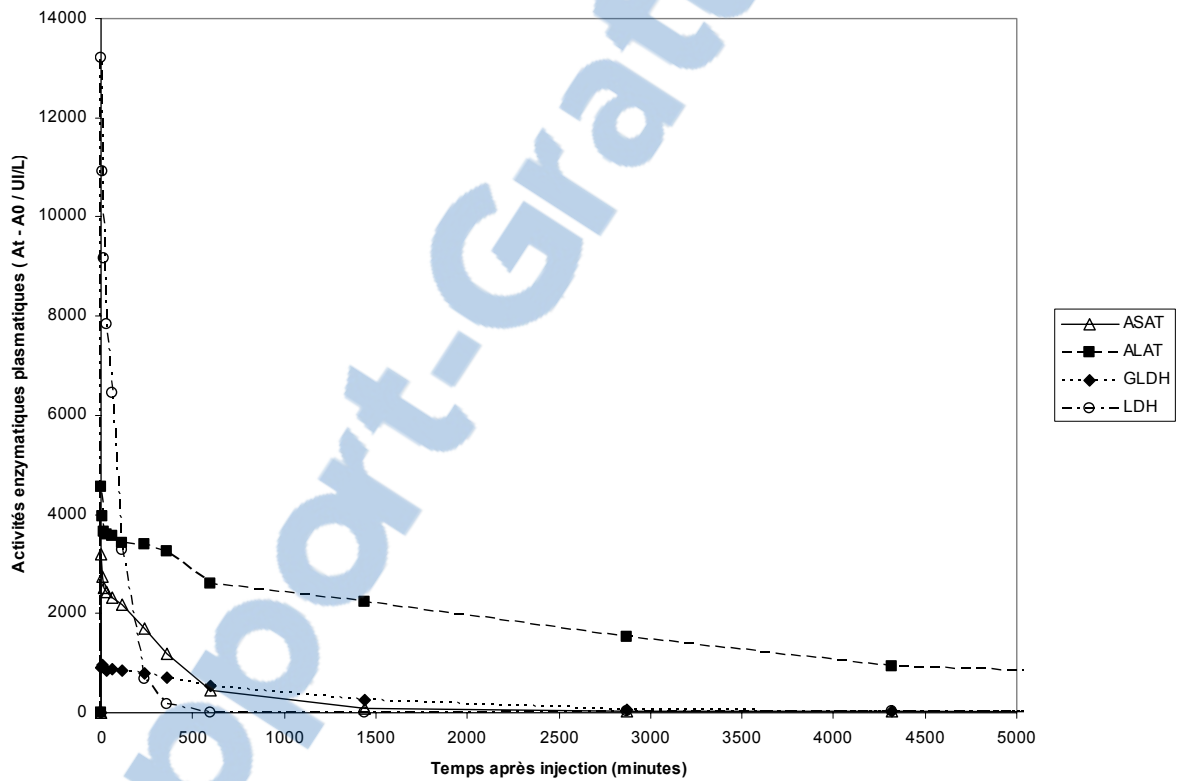


Figure 20 : Profils plasmatiques des 4 enzymes chez le chien 3, après injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie

III. Analyse des résultats : calcul des paramètres pharmacocinétiques

Les différents paramètres pharmacocinétiques calculés sont rapportés dans les paragraphes suivants :

1. Stabilité nyctémérale

Les figures 13, 14 et 15 montrent qu'il existe des différences significatives entre l'activité de l'ALAT à T₀ et les activités à T_{6h}, à T_{8h}, à T_{10h} et à T_{24h}. Il en est de même pour l'ASAT entre T₀ et T_{6h}, T_{8h}, T_{10h}, T_{12h} et T_{24h}, et pour la GLDH entre T₀ et T_{8h}, T_{10h} et T_{12h}.

Il est en revanche impossible de savoir si les activités de la LDH sur 24 heures sont significativement différentes car celles-ci étaient le plus souvent situées en dessous de la limite de détection de l'analyseur. En revanche, on peut estimer en se référant aux valeurs usuelles chez le chien que si des variations existent, elles sont modérées.

2. Paramètres pharmacocinétiques de l'ALAT

L'ALAT a une activité plasmatique basale de 32 U/L (\pm 11 U/L). Son temps de demi-vie est de 2,44 jours (\pm 0,36 jours), soit 58,6 heures (\pm 8,5 h), sa clairance de 1,0 mL/kg/h (\pm 0,2 mL/kg/h) et son volume de distribution de 77mL/kg (\pm 15 mL/kg). Ces données sont présentées chien par chien dans le tableau 25.

Tableau 25 : Paramètres cinétiques de l'ALAT

(où AUC est l'aire sous la courbe d'activité plasmatique de l'ALAT en fonction du temps, MRT est le temps moyen de résidence et V_{ss} est le volume de distribution à l'équilibre)

| Chien | Activité basale (U/L) | Temps de demi-vie (jours) | Clairance (mL/kg/h) | MRT (jours) | V_{ss} (mL/kg) |
|-------------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------------|
| A | 25 | 2,36 | 1,1 | 2,96 | 78 |
| B | 25 | 2,97 | 0,8 | 3,53 | 69 |
| C | 53 | 2,24 | 1,0 | 3,33 | 84 |
| D | 34 | 2,69 | 0,8 | 3,16 | 60 |
| E | 29 | 2,08 | 1,0 | 2,73 | 69 |
| F | 35 | 2,03 | 1,1 | 2,72 | 74 |
| G | 21 | 2,72 | 1,2 | 3,64 | 107 |
| Moyenne | 32 | 2,44 | 1,0 | 3,15 | 77 |
| Écart-type | 11 | 0,36 | 0,2 | 0,37 | 15 |

3. Paramètres pharmacocinétiques de l'ASAT

L'ASAT a une activité plasmatique basale plus basse que l'ALAT, de 21 U/L (± 3 U/L). Son temps de demi vie est plus court, de 0,92 jours ($\pm 0,66$ jours), soit 21,9 heures ($\pm 14,8$ h) et sa clairance plus élevée, de 7,5 mL/kg/h ($\pm 1,9$ mL/kg/h). Son volume de distribution est similaire, de 82 mL/kg (± 51 mL/kg) (tableau 26).

Tableau 26 : Paramètres cinétiques de l'ASAT

(où AUC est l'aire sous la courbe d'activité plasmatique de l'ASAT en fonction du temps, MRT est le temps moyen de résidence et Vss est le volume de distribution à l'équilibre)

| Chien | Activité basale (U/L) | Temps de demi-vie (jours) | Clairance (mL/kg/h) | MRT (jours) | Vss (mL/kg) |
|-------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|-------------|-------------|
| A | 25 | 0,52 | 7,6 | 0,35 | 64 |
| B | 20 | 0,67 | 5,2 | 0,32 | 40 |
| C | 23 | 0,34 | 8,2 | 0,30 | 60 |
| D | 22 | 2,06 | 5,4 | 0,61 | 80 |
| E | 18 | 0,87 | 6,5 | 0,41 | 64 |
| F | 23 | 0,38 | 9,8 | 0,30 | 71 |
| G | 15 | 1,57 | 9,8 | 0,82 | 194 |
| Moyenne | 21 | 0,92 | 7,5 | 0,45 | 82 |
| Écart-type | 3 | 0,66 | 1,9 | 0,20 | 51 |

4. Paramètres pharmacocinétiques de la GLDH

La particularité de la GLDH est sa très faible activité plasmatique basale : 3,1 U/L ($\pm 0,6$ U/L). Son temps de demi-vie est de 1,19 jours ($\pm 0,60$ jours), soit 28,6 heures ($\pm 14,8$ h), proche de celui de l'ASAT. Sa clairance plasmatique se rapproche de celle de l'ALAT : 2,6 mL/kg/h ($\pm 0,3$ mL/kg/h). Son volume de distribution de 57 mL/kg (± 9 mL/kg) est proche de ceux des 3 autres enzymes étudiées (tableau 27).

Tableau 27 : Paramètres cinétiques de la GLDH

(où AUC est l'aire sous la courbe d'activité plasmatique de la GLDH en fonction du temps, MRT est le temps moyen de résidence et Vss est le volume de distribution à l'équilibre)

| Chien | Activité basale (U/L) | Temps de demi-vie (jours) | Clairance (mL/kg/h) | MRT (jours) | Vss (mL/kg) |
|-------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|-------------|-------------|
| A | 2,9 | 0,57 | 2,7 | 0,80 | 52 |
| B | 2,6 | 2,14 | 2,3 | 1,05 | 57 |
| C | 2,3 | 1,22 | 3,2 | 0,90 | 68 |
| D | 3,0 | 0,96 | 2,4 | 0,97 | 55 |
| E | 4,0 | 0,88 | 2,4 | 0,86 | 49 |
| F | 3,8 | 0,67 | 2,4 | 0,82 | 47 |
| G | 3,3 | 1,90 | 2,9 | 0,99 | 70 |
| Moyenne | 3,1 | 1,19 | 2,6 | 0,91 | 57 |
| Écart-type | 0,6 | 0,60 | 0,3 | 0,10 | 9 |

5. Paramètres pharmacocinétiques de la LDH

L'activité plasmatique de base de la LDH est de 127 U/L (± 20 U/L). Son temps de demi-vie est considérablement plus court que ceux de l'ALAT et de l'ASAT : 54 minutes (± 14 min). Sa clairance plasmatique est plus importante, de 40,3 mL/kg/h ($\pm 11,4$ mL/kg/h). Son volume de distribution à l'équilibre est du même ordre de grandeur que celui des transaminases et de la GLDH : 51 mL/kg (± 8 mL/kg) (tableau 28).

Tableau 28 : Paramètres cinétiques de la LDH

(où AUC est l'aire sous la courbe d'activité plasmatique de la LDH en fonction du temps, MRT est le temps moyen de résidence et Vss est le volume de distribution à l'équilibre)

| Chien | Activité basale (U/L) | Temps de demi-vie (min) | Clairance (mL/kg/h) | MRT (min) | Vss (mL/kg) |
|-------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|-----------|-------------|
| A | 148 | 57,8 | 44,8 | 85,5 | 64 |
| B | 122 | 54,3 | 30,0 | 88,8 | 44 |
| C | 116 | 56,2 | 38,8 | 81,3 | 53 |
| D | 100 | 67 | 27,1 | 92,7 | 42 |
| E | 114 | 71,9 | 33,8 | 82,2 | 46 |
| F | 158 | 32,3 | 59,5 | 49,8 | 49 |
| G | 131 | 41,6 | 48,1 | 71,4 | 57 |
| Moyenne | 127 | 54 | 40,3 | 79 | 51 |
| Écart-type | 20 | 14 | 11,4 | 14 | 8 |

6. Synthèse

Les principaux paramètres pharmacocinétiques des 4 enzymes que nous étudions sont regroupés dans le tableau 29. D'un point de vue pharmacocinétique, on peut classer les enzymes en 3 groupes :

- ALAT, qui a une clairance très basse et un temps de demi-vie très long ;
- ASAT et GLDH, qui ont des clairances plus élevées, et des temps de demi-vie plus courts ;
- LDH, dont la clairance est élevée et le temps de demi-vie court.

Ces 4 enzymes ont des volumes de distribution à l'équilibre similaires, compris entre 51 mL/kg pour la LDH et 82 mL/kg pour l'ASAT.

Tableau 29 : Principaux paramètres pharmacocinétiques des enzymes étudiées (où V_{SS} est le volume de distribution à l'équilibre)

| | Temps de demi-vie (h) | V_{SS} (mL/kg) | Clairance (mL/kg/h) |
|-------------|----------------------------------|--|--------------------------------|
| ALAT | 58,6 ± 8,5 | 77 ± 15 | 1,0 ± 0,2 |
| ASAT | 21,9 ± 14,8 | 82 ± 51 | 7,5 ± 1,9 |
| GLDH | 28,6 ± 14,5 | 57 ± 9 | 2,6 ± 0,4 |
| LDH | 0,9 ± 0,2 | 51 ± 8 | 40,3 ± 11,4 |

IV. Discussion

1. Stabilité nycthémerale

Bien que des différences significatives existent entre les activités plasmatiques basales de l'ALAT, de l'ASAT et de la GLDH et leurs activités à des temps ultérieurs au cours du nycthémer, les variations par rapport aux moyennes d'activité plasmatique sur 24 heures sont limitées et se répartissent comme suit :

- ALAT : 36,1 U/L (\pm 20,5 U/L) à 21,4 U/L (\pm 10,7 U/L) ;
- ASAT : 26,4 U/L (\pm 2,3 U/L) à 20,7 U/L (\pm 4,6 U/L) ;
- GLDH : 4,2 U/L (\pm 0,2 U/L) à 2,6 (\pm 0,3 U/L).

L'influence de ces variations sur la ligne de base dans l'étude semble mineure.

2. Protocole expérimental

Nous avons choisi de déterminer les paramètres pharmacocinétiques des enzymes par injection intraveineuse des enzymes et mesures sériées des activités enzymatiques plasmatiques jusqu'à leur retour au niveau basal car il s'agit de la seule méthode rigoureuse permettant de les obtenir.

i. Nature de la solution injectée

Pour la créatine kinase chez le lapin, il a été démontré que les solutions enzymatiques les plus appropriées pour la détermination des paramètres pharmacocinétiques sont les solutions obtenues à partir du surnageant d'un broyat musculaire centrifugé car une lyse musculaire ne correspond pas à une libération de créatine kinase seule et purifiée, mais d'un cocktail de molécules d'origine musculaire capables d'affecter la disposition de la créatine kinase [Lefebvre, 1993].

C'est pourquoi nous avons préféré l'emploi d'un surnageant de broyat de foie à une solution commerciale d'enzymes purifiées.

ii. Nature des échantillons

Nous avons choisi de mesurer les activités plasmatiques des enzymes sur du plasma hépariné plutôt que sur du sérum, car les valeurs obtenues peuvent être faussement augmentées à cause de la coagulation qui survient dans ce dernier cas chez le chien [Friedel, 1970 ; Grottsch, 1971; Breuer, 1975 ; Caisey, 1980].

iii. Critiques du protocole expérimental

- Cas de la phosphatase alcaline

Nous avons initialement prévu d'inclure la phosphatase alcaline à nos travaux car elle est régulièrement utilisée comme marqueur de cholestase. En raison de sa présence en quantité insuffisante dans l'homogénat de foie, nous avons été contraints de l'exclure du protocole.

- Inactivation in vitro – Délai avant congélation

Reynolds *et al.* ont montré que les activités plasmatiques de l'ALAT et de l'ASAT ne sont pas modifiées par des cycles de congélation décongélation [Reynolds, 2006]. Le délai entre l'obtention des échantillons et leur congélation n'a jamais excédé 30 minutes. De plus, tous les échantillons ont été traités de la même façon, et le stockage à -80°C n'a été que de 10 jours pour les ALAT, ASAT et LDH.

- Linéarité de la cinétique plasmatique des enzymes

La linéarité de la cinétique plasmatique d'une enzyme signifie que ses paramètres pharmacocinétiques restent constants quelle que soit la valeur de l'activité plasmatique de l'enzyme. Une absence de linéarité peut être causée par la saturation de la fixation de l'enzyme à une protéine de transport, par la saturation d'une voie d'élimination, ou par une induction concentration dépendante de son élimination.

Notre protocole expérimental ne permet pas d'apprécier la linéarité de la pharmacocinétique des enzymes. Afin de la vérifier, il serait nécessaire de calculer les paramètres cinétiques en réinjectant des enzymes aux mêmes chiens à des doses différentes.

Si la clairance est variable selon la quantité d'enzymes libérées par le foie, il est illusoire de vouloir calculer une quantité de foie détruit par la méthode que nous proposons. Nous avons donc postulé que la cinétique plasmatique des enzymes est linéaire.

- Répétabilité de la cinétique plasmatique des enzymes

La répétabilité de la cinétique plasmatique est le fait que les paramètres restent constants pour un individu donné après une période de temps donnée. Pour un même individu, on peut comparer les valeurs des paramètres cinétiques, réaliser des études de toxicité hépatique, comparer différentes formulations sans craindre des modifications du comportement pharmacocinétique des enzymes étudiées.

Notre étude n'évalue pas la répétabilité de la cinétique des enzymes. Il faudrait pour cela recommencer la détermination des paramètres pharmacocinétiques des enzymes quelques semaines ou quelques mois plus tard dans les mêmes conditions.

3. Comparaison des résultats avec les études précédemment publiées

Comme nous l'avons dit dans la première partie, les études établissant les paramètres pharmacocinétiques des ALAT, ASAT, LDH et GLDH chez le chien sont rares, voire inexistantes, et anciennes. De plus, les différences existant au niveau des techniques de mesure d'activité ou des méthodes de calcul pharmacocinétique rendent les comparaisons difficiles. Il est cependant intéressant de comparer nos résultats avec ceux publiés précédemment.

i. Activités basales

Les activités plasmatiques basales que nous avons obtenues ainsi que celles provenant d'études antérieures sont rapportées dans le tableau 30.

Tableau 30 : Activités plasmatiques basales des ALAT, ASAT, LDH et GLDH chez le chien (U/L)
Comparaison des résultats de notre étude avec ceux précédemment publiés Les effectifs sont indiqués entre parenthèses quand ils sont disponibles.

| Activités enzymatiques plasmatiques | ALAT | ASAT | LDH | GLDH |
|--|------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| Résultats de notre étude | 32 ± 11 (7) | 21 ± 3 (7) | 127 ± 20 (7) | 3,1 ± 0,6 (7) |
| [Keller, 1981] | 11 – 34 (154) | 10 – 21 (154) | 17 – 54 (119) | 1 – 6 (156) |
| [Lindena, 1986] | 18,3 ± 0,81 (29) | 10,1 ± 0,51 (37) | 25,4 ± 1,23 (49) | < |
| [Kodak, 1991] | 3 – 50 (46) | 1 – 37 (48) | 105 – 1983 (50) | - |

Les résultats que nous avons obtenus sont du même ordre de grandeur que ceux précédemment publiés, malgré des différences dues aux techniques de mesure d'activité.

ii. Temps de demi-vie

Les tableaux 31 a et b rapportent les temps de demi-vie que nous avons déterminés, ainsi que ceux disponibles dans la littérature, et les protocoles utilisés.

Tableau 31 a : Temps de demi-vie (min) après injection d'enzymes chez le chien - comparaison des résultats de notre étude avec ceux précédemment publiés
Les protocoles sont détaillés dans le tableau 31 b.

| Temps de demi-vie | ALAT | ASAT | LDH | GLDH |
|---------------------------------|-------------------|------------------------------|----------------|-------------------|
| Résultats de notre étude | 3516 ± 510 | 1314 ± 888 | 54 ± 12 | 1716 ± 870 |
| [Zinkl, 1971] | 149 | 263 | 105 | 475 |
| [Fleisher, 1956] | - | 720 | - | - |
| [Fleisher et Wakim, 1963] | 3660 | 708 (ASAT I) 54 (ASAT II) | - | - |
| [Reichard, 1959] | 1200 | - | - | - |
| [Stranjörd, 1981] | - | - | < 360 | - |
| [Ettinger, 2005] | 3600 | 300 - 720 | - | - |

Tableau 31 b : Protocoles de détermination des temps de demi-vie chez le chien - comparaison de notre étude avec celles précédemment publiées

| Publications | Protocole expérimental | Dose | Nombre d'animaux | Méthode de dosage | Méthode de calcul PK |
|---------------------------|--|---|---|------------------------------|---------------------------|
| Notre étude | Injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie | Tableau 24 | 7 | Automates | Analyse non-compartiment. |
| [Zinkl, 1971] | Injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie | - | 3 | DNPH | - |
| [Fleisher, 1956] | Injection IV d'enzymes purifiées et séparées | 0,5 mL/kg | 2 | Karmen | - |
| [Fleisher et Wakim, 1963] | Injection IV d'enzymes purifiées et séparées | - | 5 (ALAT) 12 (ASAT I) 16 (ASAT II) | DNPH (ALAT) Karmen (ASAT) | Analyse compartiment. |
| [Stranjörd, 1959] | Injection de LDH (cœur de lapin) dans les veines porte ou cave | 0,1 à 0,2 mL/kg de solution | - | Hill et Lévi modifiée | - |
| [Reichard, 1959] | Injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie | 2 mL de solution à 700 µM C ¹⁴ O ₂ par mL d'OCT | 3 | Reitman et Frankel / Karmen | - |

Nos temps de demi-vie sont très différents de ceux obtenus par Zinkl *et al.* [Zinkl, 1971], ou par Reichard [Reichard, 1959] bien que la méthode employée soit identique (cinétique après injection d'un homogénat de foie). Les détails des calculs pharmacocinétiques ne sont malheureusement pas disponibles dans les publications, mais leurs méthodes d'analyse pharmacocinétique semblent différentes de celle que nous avons utilisée : leurs courbes de décroissance d'activité enzymatique ne sont pas réalisées jusqu'au retour au niveau d'activité enzymatique basale. Les différences peuvent aussi s'expliquer par des techniques de mesures d'activité différentes. Leurs valeurs d'activités sériques basales sont cependant du même ordre de grandeur que nos valeurs d'activités plasmatiques basales.

Nous sommes également en désaccord avec les résultats attribués à Fleisher *et al.* [Fleisher, 1956] pour l'ASAT. Cependant, ces temps de demi-vie, rapportés par un article de revue [Freedland, 1970] ne sont pas disponibles dans l'article original [Fleisher, 1956]. Il est probable que ces derniers ont été évalués graphiquement lors de la rédaction de l'article de

revue. De plus, Fleisher et al. ont utilisé des enzymes purifiées et séparées alors que nous avons administré le surnageant d'un homogénat de foie.

Le temps de demi-vie attribué à Stranjör et al. Stranjörd, 1981 est compatible avec nos résultats : inférieur à 360 minutes pour la LDH. Cependant, ce résultat, rapporté dans l'article de revue de Freedland Freedland, 1970 n'est pas donné dans l'article original correspondant. De plus, leur LDH provenait d'un homogénat de myocarde de lapin alors que nous avons utilisé le surnageant d'un homogénat de foie de chien : la composition en isoenzymes n'est donc pas la même.

Le temps de demi-vie établi par Fleisher et Wakim pour l'ALAT (360 minutes) concorde avec le nôtre. En revanche, ceux qu'ils avancent pour l'ASAT sont différents mais nous avons utilisé le surnageant d'un homogénat de foie alors qu'ils ont injecté des enzymes séparées et purifiées. De plus, les activités enzymatiques ont été déterminées par des méthodes différentes. Les méthodes de calcul pharmacocinétiques ne sont pas publiées.

Ainsi, les différences observées entre les temps de demi-vie que nous avons obtenus et ceux des études précédentes peuvent s'expliquer par :

- des différences de méthode expérimentale concernant la mesure des activités enzymatiques ou de la nature et de la quantité d'enzymes injectées ;
- des différences d'analyse pharmacocinétique. Ces dernières ne sont pas documentées dans la plupart des articles donnant des valeurs de demi-vie.

Il est probable que, dans ces cas, le temps de demi-vie a été déterminé en calculant le temps nécessaire pour que l'activité enzymatique diminue de moitié par rapport à l'activité maximale, d'autant plus que certains auteurs n'ont pas suivi la décroissance d'activité enzymatique jusqu'au retour au niveau d'activité enzymatique basale.

Cela ne correspond pas à la définition pharmacocinétique de la demi-vie, qui est le temps nécessaire à diviser la concentration plasmatique d'un analyte par deux après atteinte d'un état de pseudo équilibre de distribution. En fait, le temps de demi-vie ne peut être déterminé qu'au cours de la phase où la réduction des concentrations plasmatiques est exclusivement le fait de l'élimination (et non de la distribution). Toutain, 2004 - II

L'approche non compartimentale utilisée dans notre étude détermine le temps de demi-vie en tenant compte de ces points. C'est la seule approche permettant la détermination des paramètres pharmacocinétiques vrais. En outre, dans notre étude a été déterminé la clairance plasmatique des enzymes, qui est la seule grandeur permettant d'apprécier l'élimination.

iii. Volumes de distribution

Il n'existe aucun article à notre connaissance rapportant le volume de distribution à l'équilibre des ALAT, ASAT, LDH et GLDH chez le chien. Un article de revue indique cependant que les ASAT et LDH se répartissent principalement dans l'espace extravasculaire Lindena, 1986 - Ce qui ne concorde pas avec nos résultats.

Les valeurs que nous avons déterminées sont comprises entre 51 et 82 mL/kg et indiquent donc que les 4 enzymes étudiées restent majoritairement dans le secteur intravasculaire.

Elles sont du même ordre de grandeur que le volume de distribution de la créatine kinase chez le chien (65 mL/kg) [Aktas, 1995]. Ces cinq enzymes ont également le même ordre de grandeur de poids moléculaire (PM de 92 à 350 kDa pour les 4 enzymes et PM = 88 kDa pour la CK [Kaneko, 1997]), et probablement des voies d'élimination similaires.

iv. Clairance plasmatique

Comme pour le volume de distribution à l'équilibre, nous n'avons trouvé aucune étude présentant la clairance plasmatique des 4 enzymes que nous avons étudiées chez le chien. De plus, les articles rapportant des temps de demi-vie ne permettent pas de calculer la clairance, car ils ne fournissent pas leurs données brutes, mais seulement les résultats de leurs calculs pharmacocinétiques.

Les clairances que nous avons calculées sont proches de la clairance plasmatique de la créatine kinase chez le chien ($32,4 \pm 14,4$ mL/kg/h), une des seules enzymes pour laquelle ce paramètre est connu [Aktas, 1995].

4. Conséquences et applications permises par la connaissance des paramètres pharmacocinétiques

Comme nous l'avions évoqué dans la première partie, la connaissance des paramètres pharmacocinétiques des enzymes hépatiques a de nombreuses applications, autant dans le domaine de la clinique que dans celui de la recherche.

i. Conséquences pour l'interprétation des mesures d'activité plasmatique en hépatologie clinique

- Volume de distribution à l'équilibre : effet de la déshydratation

Les 4 enzymes étudiées ont des volumes de distribution à l'équilibre sensiblement identiques, compris entre 51 mL/kg pour la LDH et 82 mL/kg pour l'ASAT. Ce volume de distribution est bas, ce qui signifie que les ALAT, ASAT, LDH et GLDH se distribuent principalement dans le secteur vasculaire [Toutain, 2004 - III]. La distribution des enzymes dans l'organisme a donc peu d'influence sur la clairance. La principale conséquence pour la pratique clinique quotidienne est que la déshydratation a peu d'effet sur les activités plasmatiques de ces enzymes, à l'exception d'une déshydratation sévère.

- Temps de demi-vie et clairance plasmatique : utilisation des enzymes en pratique quotidienne

Il est important de rappeler que le temps de demi-vie est un paramètre hybride, dépendant à la fois de la clairance plasmatique et du volume de distribution à l'équilibre de l'enzyme considérée [Toutain, 2004 - II].

Les enzymes que nous avons étudiées peuvent être classées en trois groupes :

- l'ALAT, qui a une clairance plasmatique très basse ($1,0 \pm 0,2$ mL/kg/h), et un temps de demi-vie long ($58,6 \pm 8,5$ heures) ;
- les ASAT et GLDH, qui ont des clairances plasmatiques basses (respectivement $7,5 \pm 1,9$ et $2,6 \pm 0,4$ mL/kg/h), et des temps de demi-vie intermédiaires (respectivement $21,9 \pm 14,8$ et $28,6 \pm 14,5$ heures) ;
- la LDH, qui a une clairance plasmatique plus élevée ($40,3 \pm 11,4$ mL/kg/h) et un temps de demi-vie court ($0,9 \pm 0,2$ heure).

Ceci a des conséquences pour leurs utilisations en clinique.

La LDH ayant une clairance élevée, la mesure de son activité plasmatique doit être utilisée pour renseigner une lésion aiguë, peu de temps après le début du phénomène, car sinon, cela peut conduire à des faux négatifs, l'enzyme ayant déjà été éliminée du plasma si le facteur à l'origine de la lésion est supprimé [Lefebvre, 1994]. On considère qu'il faut 6 temps de demi-vie pour que l'organisme élimine totalement une enzyme, ce qui donne 5,4 heures pour la LDH.

Ainsi, face à une élévation d'activité plasmatique de LDH persistant lors de prélèvements répétés toutes les 6 heures, on peut considérer que le processus lésionnel n'est pas terminé. Toutefois, il est important de coupler la mesure de l'activité plasmatique de la LDH avec celle d'une autre enzyme, car la LDH n'est pas spécifique du foie. Elle n'est pas non plus très sensible pour détecter une lésion hépatique [Zimmerman, 1979].

L'ALAT a une clairance très faible et un temps de demi-vie très long. C'est une enzyme très spécifique du foie et assez sensible [Abdelkader, 1986 ; Piek, 1996]. Elle peut donc être très utile pour renseigner une lésion hépatique chronique, ou l'évolution d'une lésion hépatique chronique en répétant leurs mesures d'activité plasmatique à plusieurs jours d'intervalle [Ettinger, 2005]. Elle est totalement éliminée de l'organisme en environ 15 jours (règle des 6 demi-vies).

ASAT et GLDH sont en quelque sorte intermédiaires entre LDH et ALAT. De plus, l'ASAT n'est pas très spécifique du foie : la mesure de son activité plasmatique doit donc être associée à celle d'une autre enzyme plus spécifique afin d'écartier une origine autre qu'hépatique (musculaire, en mesurant l'activité plasmatique de la CK par exemple). Elle est néanmoins intéressante car elle est très sensible [Abdelkader, 1986 ; Piek, 1996]. Elle est éliminée de l'organisme en totalité en 5,5 jours.

La GLDH est, comme l'ALAT, très spécifique du foie et très sensible pour détecter une affection hépatique [Abdelkader, 1986 ; Piek, 1996]. Elle peut être utilisée de la même façon que l'ALAT, pour renseigner une lésion hépatique chronique. L'organisme l'élimine en totalité en 7 jours.

Enfin, la localisation intracellulaire des enzymes renseigne le clinicien sur la sévérité de la lésion : la GLDH (mitochondriale) signe une lésion plus sévère (nécrose) que l'ALAT et la LDH (cytosoliques), ou que l'ASAT (mixte).

Ainsi, en combinant ces informations, le clinicien peut choisir plus facilement parmi le panel d'enzymes hépatiques à sa disposition celles qui sont le mieux adaptées pour lui donner les renseignements qu'il recherche.



- Clairance plasmatique : influence du débit cardiaque

Les clairances plasmatiques des ALAT, ASAT, LDH et GLDH peuvent être qualifiées de basses [Toutain, 2004 - I]. Elles sont respectivement de 1,0 , 7,5 , 40,3 et 2,6 mL/kg/h, et sont très inférieures au débit cardiaque (6L/kg/h environ chez le chien) [Toutain, 2004 - I].

La principale application clinique est que les clairances de ces 4 enzymes sont très peu influencées par des affections qui diminuent le débit cardiaque.

Les mécanismes d'élimination des enzymes sont discutés dans le paragraphe suivant.

ii. Applications destinées à la recherche en hépatologie : calcul de la masse de foie lésé

Dans la méthode de calcul de la masse lésionnelle à partir du profil plasmatique enzymatique que nous proposons, la biodisponibilité des enzymes hépatiques est arbitrairement fixée à 100 %, car nous considérons que la totalité des enzymes libérées se retrouvent dans le sang. En effet, le foie est un organe très richement vascularisé qui possède des capillaires fenêtrés très perméables.

Cependant, à la lumière des travaux de Lindena *et al.*, il semble que ce modèle est faux. Ils ont observé que les activités enzymatiques lymphatiques étaient plus élevées que les activités plasmatiques, et en ont déduit que les enzymes hépatiques rejoindraient la circulation par l'intermédiaire de la lymphe via le canal lymphatique thoracique [Lindena, 1986 - II]. Leurs arguments paraissent discutables, car il est possible que la présence d'enzymes dans la lymphe soit simplement la conséquence de la distribution des enzymes après atteinte du secteur plasmatique.

Si on suppose que la biodisponibilité des enzymes est de 100 %, la masse de foie lésé lors d'une affection hépatique peut être calculée d'après la courbe de décroissance de l'activité enzymatique plasmatique en fonction du temps :

$$W_{\text{Foie lésé}} = \frac{Cl_{\text{tot}} \times \text{AUC}}{[\text{enzyme}]_{\text{Foie}}}$$

où $W_{\text{Foie lésé}}$ est la masse de foie lésé,
 Cl_{tot} est la clairance plasmatique de l'enzyme considérée,
AUC est l'aire sous la courbe de l'activité enzymatique en fonction du temps,
 $[\text{enzyme}]_{\text{Foie}}$ est la concentration du foie en l'enzyme considérée.

Ainsi, selon l'enzyme considérée, la relation est :

- pour l'ALAT : $W_{\text{Foie lésé}} = 1,215 \cdot 10^{-3} \times \text{AUC}$
- pour l'ASAT : $W_{\text{Foie lésé}} = 6,140 \cdot 10^{-3} \times \text{AUC}$
- pour la GLDH : $W_{\text{Foie lésé}} = 8,609 \cdot 10^{-3} \times \text{AUC}$
- pour la LDH : $W_{\text{Foie lésé}} = 11,48 \cdot 10^{-3} \times \text{AUC}$

Outre la connaissance de la biodisponibilité (fixée arbitrairement à 100 %), l'utilisation de ces formules nécessite aussi de s'assurer que la clairance des enzymes est répétable et linéaire. La biodisponibilité des enzymes hépatiques pourrait être obtenue en injectant des enzymes par voie intra hépatique (site de libération des enzymes lors de lésion hépatique), ce qui semble difficile car cela induirait une lésion. Une alternative serait d'utiliser des enzymes radio marquées.

Ces équations doivent également être validées par des études toxicologiques.

Cette application trouve son intérêt lors de tests de toxicité hépatique précédant la mise sur le marché d'un médicament, par exemple, et permet de comparer des formulations. Elle donne également une signification plus parlante que des mesures d'activité plasmatique en clinique.

5. Clairance et mécanismes d'élimination

Bien que les mécanismes d'élimination des enzymes ne soient pas connus, il est possible, grâce aux valeurs de clairances plasmatiques que nous avons déterminées, d'émettre des hypothèses.

Tout d'abord, le poids moléculaire des enzymes étant supérieur au seuil de filtration glomérulaire (68 kDa), ces enzymes ne peuvent pas être éliminées par filtration au niveau du rein. Elles ne se retrouvent pas dans l'urine après injection intraveineuse d'un surnageant d'homogénat de foie [Fleisher, 1963 - I ; Wakim, 1963 - II ; Fleisher 1963 - III].

Ces 4 enzymes ont des clairances inférieures à 0,5 % du débit hépatique (2,28 L/kg/h chez le chien) [Katz, 1969], ce qui signifie que, si le foie joue un rôle dans leur élimination, ce dernier est peu efficace.

La LDH a la clairance la plus élevée parmi les 4 enzymes étudiées. Il a été démontré chez le rat que l'élimination de l'isoenzyme 5 de la LDH, isoenzyme majoritaire dans le foie, fait intervenir les macrophages du système réticulo-endothélial (foie, rate, moelle osseuse) [De Jong, 1982].

L'ASAT a une clairance beaucoup plus faible, mais nettement supérieure à celles de l'ALAT. L'isoenzyme II de l'ASAT serait éliminée par le même mécanisme que la LDH 5 [Smit, 1987]. En revanche, le mécanisme d'élimination de l'ASAT I n'est pas connu. Les valeurs de clairance plasmatique sont compatibles avec ces hypothèses : si l'ASAT II est éliminée rapidement, comme la LDH, et si l'ASAT I est éliminée plus lentement, avec des modalités différentes, la clairance plasmatique moyenne de l'ASAT est relativement basse. Il serait intéressant de mesurer les clairances plasmatiques des 2 isoenzymes séparément et de

comparer la moyenne pondérée par les proportions de chaque isoenzyme dans le plasma avec la clairance plasmatique moyenne de l'ASAT.

L'ALAT a une clairance plasmatique plus faible. Mahy *et al.* ont émis l'hypothèse d'un mécanisme d'élimination différent [Mahy, 1967 ; Mahy, 1965 - IV].

Les modalités de clairance de la GLDH n'ont pas été étudiées à notre connaissance. Sa clairance plasmatique est beaucoup plus faible que celle de la LDH. En revanche, elle est du même ordre de grandeur que la clairance plasmatique de l'ASAT.

Conclusion

Bien que les fonctions, les distributions tissulaires et les activités plasmatiques des ALAT, ASAT, LDH et GLDH soient bien documentées, notre étude est la première, à notre connaissance, à comparer plusieurs paramètres pharmacocinétiques de ces 4 enzymes.

La connaissance de ces différentes valeurs permet d'améliorer leur utilisation en hépatologie clinique, en pharmacologie ou en toxicologie. Les principaux points se dégageant de cette étude sont les suivants :

- Les volumes de distribution des ALAT, ASAT, LDH et GLDH étant faibles, ces dernières se retrouvent quasi-exclusivement dans le secteur vasculaire après leur libération par le foie. Leurs activités plasmatiques sont donc peu affectées lors de déshydratation.
- Leurs clairances sont faibles : leurs éliminations sont peu affectées lors de chute du débit cardiaque.
- Selon le renseignement recherché, le clinicien peut choisir la ou les enzymes les plus adaptées en fonction de la clairance de ces dernières : la connaissance des temps de demi-vie des enzymes permet de savoir à quels intervalles réaliser des prélèvements lors du suivi d'une lésion hépatique. L'activité plasmatique de la LDH est la première à décroître dès 6 heures après la fin du processus pathologique.
- Notre étude propose des équations permettant de calculer la masse de foie lésé lors d'hépatopathie après obtention de la courbe de l'activité plasmatique enzymatique en fonction du temps. Cette méthode présente plusieurs avantages : elle est non invasive, éthiquement acceptable, simple à mettre en œuvre, et présente un coût limité. Elle permet de plus de comparer différents produits sur un même animal, contrairement aux méthodes nécessitant des analyses anatomopathologiques. Une étude morphologique serait nécessaire afin de valider ce concept.

Cependant, plusieurs questions fondamentales restent en suspens :

- Les mécanismes d'élimination des 4 enzymes sont inconnus, bien que la connaissance de leurs clairances permette de conforter certaines hypothèses ;
- L'activité plasmatique des enzymes reflète-t-elle bien leurs concentrations massiques ? la mise au point d'un dosage massique serait peut-être préférable ;
- Enfin, l'utilisation des équations que nous proposons suppose une biodisponibilité de 100% : il serait nécessaire de déterminer cette biodisponibilité à partir du foie. Cette méthode devrait également être validée par des études toxicologiques.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mr RIVES Augustin, Marie

a été admis(e) sur concours en : 2002

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 14 Mai 2007

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Olivier DOSSIN, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :

Mr RIVES Augustin, Marie

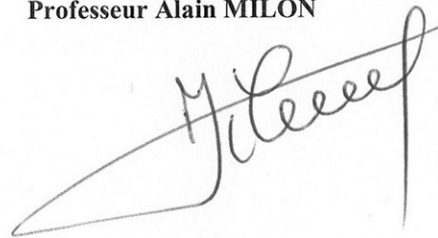
intitulée :

«Pharmacocinétique d'enzymes hépatiques chez le chien.»

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Olivier DOSSIN**




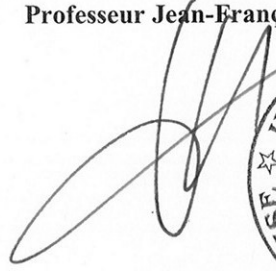
**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Jean-Pierre VINEL**



**Vu le : 25 MAI 2007
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUPEREAU**



Annexe 1

Annexe 1 a : Activités plasmatiques de l'ALAT (U/L) sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle

| Temps (heures) | Chien A | Chien B | Chien C | Chien D | Chien E | Chien F | Chien G |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0 | 18 | 22 | 67 | 46 | 23 | 31 | 30 |
| 2 | 16 | 23 | 74 | 54 | 24 | 30 | 32 |
| 4 | 22 | 27 | 62 | 37 | 13 | 23 | 24 |
| 6 | 19 | 16 | 54 | 38 | 14 | 23 | 22 |
| 8 | 10 | 16 | 61 | 38 | 16 | 22 | 23 |
| 10 | 14 | 16 | 57 | 41 | 12 | 20 | 22 |
| 12 | 13 | 19 | 62 | 42 | 14 | 23 | 25 |
| 24 | 13 | 14 | 42 | 29 | 14 | 16 | 22 |
| Moyenne | 15,625 | 19,125 | 59,875 | 40,625 | 16,25 | 23,5 | 25 |
| Écart-Type | 3,889 | 4,486 | 9,433 | 7,289 | 4,62 | 4,93 | 3,89 |

Annexe 1 b : Activités plasmatiques de l'ASAT (U/L) sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle

| Temps (heures) | Chien A | Chien B | Chien C | Chien D | Chien E | Chien F | Chien G |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0 | 26 | 24 | 30 | 26 | 24 | 26 | 29 |
| 2 | 23 | 23 | 29 | 27 | 23 | 24 | 33 |
| 4 | 24 | 21 | 22 | 20 | 18 | 27 | 30 |
| 6 | 19 | 17 | 25 | 23 | 16 | 23 | 25 |
| 8 | 17 | 17 | 25 | 25 | 16 | 23 | 28 |
| 10 | 20 | 16 | 21 | 23 | 15 | 21 | 29 |
| 12 | 19 | 17 | 23 | 22 | 19 | 21 | 27 |
| 24 | 27 | 17 | 24 | 21 | 18 | 20 | 25 |
| Moyenne | 21,875 | 19 | 24,875 | 23,375 | 18,625 | 23,125 | 28,25 |
| Écart-Type | 3,643 | 3,162 | 3,182 | 2,446 | 3,292 | 2,475 | 2,659 |

Annexe 2

Annexe 2 a. : Activités plasmatiques de la LDH (U/L) sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle

| Temps (heures) | Chien A | Chien B | Chien C | Chien D | Chien E | Chien F | Chien G |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0 | < 100 | 117 | 130 | < 100 | 172 | 145 | 145 |
| 2 | < 100 | 133 | < 100 | < 100 | < 100 | < 100 | 144 |
| 4 | < 100 | < 100 | < 100 | < 100 | 126 | 123 | < 100 |
| 6 | < 100 | < 100 | < 100 | < 100 | < 100 | < 100 | < 100 |
| 8 | < 100 | 102 | 114 | < 100 | < 100 | 133 | 114 |
| 10 | < 100 | < 100 | < 100 | < 100 | 119 | 101 | 104 |
| 12 | < 100 | < 100 | - | < 100 | 119 | 102 | 132 |
| 24 | < 100 | < 100 | 104 | < 100 | < 100 | 118 | 147 |
| Moyenne | - | - | - | - | - | - | - |
| Écart-Type | - | - | - | - | - | - | - |

Annexe 2 b. : Activités plasmatiques de la GLDH (U/L) sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle

| Temps (heures) | Chien A | Chien B | Chien C | Chien D | Chien E | Chien F | Chien G |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0 | 3,2 | 3,2 | 3,1 | 4,2 | 3,7 | 4,1 | 3,2 |
| 2 | 2,9 | 2,9 | 2,7 | 3,5 | 3,8 | 3,9 | 3,2 |
| 4 | 2,7 | 2,5 | 2,7 | 4 | 4 | 3,7 | 3,1 |
| 6 | 2,6 | 2,6 | 2,8 | 4 | 4,3 | 3,6 | 3,3 |
| 8 | 2,5 | 2,5 | 2,7 | 3,8 | 4,4 | 3,8 | 3,2 |
| 10 | 2,2 | 3,1 | 2,6 | 3,6 | 4,4 | 3,6 | 2,9 |
| 12 | 2,6 | 2,9 | 2,2 | 3,3 | 4,3 | 3,7 | 3,5 |
| 24 | - | 3,4 | 2,2 | - | 4 | 4,4 | 4,3 |
| Moyenne | 2,671 | 2,888 | 2,625 | 3,771 | 4,113 | 3,85 | 3,338 |
| Écart-Type | 0,314 | 0,336 | 0,301 | 0,320 | 0,275 | 0,278 | 0,424 |

Annexe 3

Annexe 3 : Activités plasmatiques de l'ALAT (U/L) après injection du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle

| Temps (heures) | Chien A | Chien B | Chien C | Chien D | Chien E | Chien F | Chien G |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0 | 25 | 25 | 53 | 34 | 29 | 35 | 21 |
| 2 min | 4104 | 5286 | 4596 | 5262 | 3882 | 2442 | 3348 |
| 5 min | 4104 | 4812 | 4020 | 4788 | 4086 | 2616 | 3264 |
| 0,25 | 3894 | 4728 | 3690 | 4546 | 3918 | 2736 | 3042 |
| 0,5 | 3678 | 4596 | 3654 | 4728 | 3636 | 2280 | 3024 |
| 1 | 3678 | 4242 | 3606 | 4320 | 3942 | 2064 | 3072 |
| 2 | 3552 | 4452 | 3468 | 4466 | 3906 | 2112 | 2892 |
| 4 | 3540 | 4524 | 3456 | 4266 | 3258 | 1962 | 2730 |
| 6 | 3168 | 4308 | 3300 | 4014 | 3276 | 1770 | 2748 |
| 10 | 2952 | 3840 | 2664 | 3978 | 2976 | 1614 | 2454 |
| 24 | 2268 | 2874 | 2298 | 3090 | 2208 | 1181 | 1800 |
| 48 | 1488 | 1730 | 1588 | 2040 | 1422 | 787 | 1164 |
| 72 | 923 | 1467 | 981 | 1474 | 856 | 583 | 825 |
| 120 | 530 | 686 | 629 | 747 | 501 | 336 | 532 |
| 168 | 317 | 407 | 423 | 430 | 296 | 174 | 358 |
| 240 | 161 | 222 | 226 | 228 | 128 | | 186 |
| 336 | 59 | 155 | 122 | 92 | 55 | 45 | 92 |
| 432 | 19 | 59 | 62 | 60 | 23 | 20 | 38 |

Annexe 4

Annexe 4 : Activités plasmatiques de l'ASAT (U/L) après injection du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle

| Temps (heures) | Chien A | Chien B | Chien C | Chien D | Chien E | Chien F | Chien G |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0 | 25 | 20 | 23 | 22 | 18 | 23 | 15 |
| 2 min | 2964 | 3792 | 3222 | 3726 | 3772 | 1632 | 2358 |
| 5 min | 2916 | 3564 | 2760 | 3414 | 2080 | 1782 | 2268 |
| 0,25 | 2760 | 3468 | 2550 | 3274 | 2844 | 1878 | 2076 |
| 0,5 | 2652 | 3240 | 2454 | 3516 | 2664 | 1536 | 2094 |
| 1 | 2592 | 3090 | 2352 | 2880 | 2982 | 1308 | 2088 |
| 2 | 2202 | 3264 | 2190 | 3132 | 2748 | 1134 | 1740 |
| 4 | 1746 | 2790 | 1710 | 2322 | 1698 | 654 | 1128 |
| 6 | 1074 | 2010 | 1206 | 1680 | 1188 | 396 | 696 |
| 10 | 552 | 912 | 474 | 822 | 492 | 216 | 336 |
| 24 | 142 | 108 | 112 | 114 | 92 | 62 | 89 |
| 48 | 40 | 39 | 40 | 52 | 51 | 33 | 50 |
| 72 | 33 | 31 | 45 | 44 | 33 | 31 | 34 |
| 120 | 29 | 26 | 32 | 33 | 26 | 24 | 27 |
| 168 | 22 | 22 | 28 | 27 | 26 | 23 | 26 |
| 240 | 28 | 24 | 25 | 26 | 24 | | 26 |
| 336 | 21 | 22 | 26 | 24 | 21 | 23 | 22 |
| 432 | 13 | 14 | 14 | 19 | 16 | 14 | 18 |

Annexe 5

Annexe 5 : Activités plasmatiques de la GLDH (U/L) après injection du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle

| Temps (heures) | Chien A | Chien B | Chien C | Chien D | Chien E | Chien F | Chien G |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0 | 2,9 | 2,6 | 2,3 | 3 | 4 | 3,8 | 3,3 |
| 2 min | 1486 | 1803 | 911,5 | 1715 | 1588 | 847 | 1337 |
| 5 min | 883 | 1267 | 973 | 1283 | 1098 | 794 | 1045 |
| 0,25 | 892 | 1260 | 912 | 1244 | 1084 | 776 | 1019 |
| 0,5 | 902 | 1178 | 842 | 1237 | 1145 | 902 | 783 |
| 1 | 702 | 1151 | 891 | 912 | 962 | 839 | 896 |
| 2 | 801 | 798 | 838 | 941 | 942 | 595 | 797 |
| 4 | 747 | 901 | 808 | 859 | 883 | 563,5 | 768 |
| 6 | 811 | 818 | 701,5 | 785 | 844 | 491,6 | 808 |
| 10 | 721 | 658 | 551 | 680 | 617 | 373 | 553 |
| 24 | 337 | 451 | 244 | 387 | 312 | 162 | 286 |
| 48 | 90 | 93 | 70 | 102 | 89 | 64,5 | 81 |
| 72 | 34 | 51 | 36,2 | 51 | 37,5 | 24,9 | 36,6 |
| 120 | 2,6 | 12 | 6,7 | 13 | 10,4 | 6,1 | 10,8 |
| 168 | 4,9 | 6,4 | 5 | 5,7 | 5,6 | 4,2 | 6,7 |
| 240 | 4,5 | 4,4 | 2,8 | 2,5 | 5,4 | 5 | 4,5 |
| 336 | 3,7 | 11 | 2,7 | 3,2 | 4,4 | 0,9 | 4,9 |
| 432 | 3,3 | 3,5 | 3,2 | 2,3 | 4,5 | 4,4 | 3,6 |

Annexe 6

Annexe 6 : Activités plasmatiques de la LDH (U/L) après injection du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle

| Temps (heures) | Chien A | Chien B | Chien C | Chien D | Chien E | Chien F | Chien G |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0 | 148 | 122 | <100 | <100 | 114 | 158 | <100 |
| 2 min | 10784 | 14920 | 13312 | 15336 | 13920 | 7625,5 | 10164 |
| 5 min | 10641 | 13504 | 11021 | 14640 | 13164 | 6816 | 10212 |
| 0,25 | 8763 | 12176 | 9276 | 13186 | 11686 | 5376 | 8664 |
| 0,5 | 5925 | 11820 | 7926 | 10776 | 8760 | 3645 | 6846 |
| 1 | 5469 | 6534 | 6558 | 8118 | 6172 | 2174 | 5538 |
| 2 | 2767 | 4770 | 3393 | 5202 | 3165 | 979,5 | 2904 |
| 4 | 945 | 1032 | 774 | 1226 | 583 | 198 | 501 |
| 6 | 262 | 445 | 283 | 406 | 242 | <100 | 181 |
| 10 | 116 | 127 | 103 | 135 | 192 | 109 | 202 |
| 24 | 105 | <100 | <100 | 176 | 127 | 152 | 196 |
| 48 | 104 | 109 | 117 | <100 | 154 | 199 | 232 |
| 72 | <100 | 144 | 141 | 184 | 309 | 209 | 201 |
| 120 | <100 | 119 | 115 | 124 | 172 | <100 | <100 |
| 168 | <100 | 139 | 119 | 120 | 195 | 159 | 156 |
| 240 | <100 | <100 | 117 | <100 | 152 | 209 | 216 |
| 336 | <100 | 107 | 108 | 131 | 157 | 178 | 153 |
| 432 | <100 | 156 | 147 | 137 | 207 | 191 | 140 |

Références bibliographiques

1. ABDELKADER S.V., HAUGE J.G.: Serum enzyme determination in the study of liver disease in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavia*, 1986, **27 (1)**, 59-70
2. AGUILERA-TEREJO E., MAYER-VALOR R., GOMEZ-CARDENAS G.: Spectrophotometric method for differentiation of cardiac and hepatic lactate dehydrogenase activities in dogs, *American Journal of Veterinary Research*, 1989, **50 (7)**, 1128-1130
3. AKTAS M., LEFÈBVRE H.P., TOUTAIN P.L., BRAUN J.P.: Disposition of creatine kinase activity in dog plasma following intravenous and intramuscular injection of skeletal muscle homogenates. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1995, **18**, 1-6
4. APELLA E., MARKET C.L.: Dissociation of lactate dehydrogenase into subunits with guanidine hydrochloride. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1961, **6**, 171-176
5. BADYLAK S.F., VAN VLEET J.F.: Tissue γ -glutamyl transpeptidase activity and hepatic ultrastructural alterations in dogs with experimentally induced glucocorticoid hepatopathy. *American Journal of Veterinary Research*, 1982, **43 (4)**, 649-655
6. BÄR U., FRIEDEL R., HEINE H., MAYER D., OHLENDORF S., SCHMIDT F.W., TRAUTSCHOLD I.: *Enzyme*, 1972-1973, **14**, 133-156
7. BARROS VIDAL L.: Évaluation non invasive des cytolyses hépatiques chez le mouton. *Thèse, Institut National Polytechnique, Toulouse*, 1996.
8. BIJSTERBOSCH M.K., DUURSMA A.M., SMIT M.J., BOS O.J.M., BOUMA J.M.W., GRUBER M.: Several dehydrogenases and kinases compete for endocytosis from plasma by rat tissues. *Biochemical Journal*, 1985, **229**, 409-417
9. BREUER J., STUCKY W.: Enzyme activities in serum and plasma of man, dog and rat, and the variation of these enzyme activities during storage of the blood. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1975, **13 (8)**, 355-360
10. CAISEY J.D., KING D.J.: Clinical chemical values for some common laboratory animals. *Clinical chemistry*, 1980, **26 (13)**, 1877-1879
11. CHANOIT G.P., LEFEBVRE H.P., ORCEL K., LAROUTE V., TOUTAIN P.L., BRAUN J.P.: Use of plasma creatine kinase pharmacokinetics to estimate the amount of exercise-induced muscle damage in Beagles. *American Journal of Veterinary Research*, 2001, **62 (9)**, 1375-1380
12. COMAZZI S., PIERALISI C., BERTAZZOLO W.: Haematological and biochemical abnormalities in canine blood : frequency and associations in 1022 samples. *Journal of Small Animal Practice*, 2004, **45**, 343-349

13. DABEW D., MAHLBERG F.A.: Enzyme activities in serum of rabbits and rats – reference values and circadian alterations. Serum enzymes and factors that influence their activity - I. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1976, **14**, 561-567
14. DE JONG A.S.H., DUURSMA A.M., BOUMA J.M.W., GRUBER M., BROUWER A., KNOOK D.L.: Endocytosis of lactate dehydrogenase isoenzyme M₄ in rats in vivo. *Biochemical Journal*, 1982, **202**, 655-660
15. DUNN M., MARTINS J., REISSMANN K.R.: The disappearance rate of glutamic oxalacetic transaminase from the circulation and its distribution in the body's fluid compartments and secretions. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1958, **51** (2), 259-265
16. EASTMAN KODAK COMPANY : Veterinary reference ranges for Kodak Ektachem clinical chemistry slides. Rochester, 1991.
17. ETTINGER S.J., FELDMAN E.C.: Textbook of Veterinary Internal Medicine – 6th Edition. *Elsevier Saunders*, Philadelphia, 2005.
18. FERRÉ P.J., CONCORDET D., LAROUTE V., CHANOIT G.P., FERRÉ J.P., MANESSE M., LEFEBVRE H.P.: Comparison of ultrasonography and pharmacokinetic analysis of creatine kinase release for quantitative assessment of postinjection damage in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 2001, **62** (11), 1698-1705
19. FLEISHER G.A., WAKIM K.G.: Transaminase in canine serum and cerebrospinal fluid after carbon tetrachloride poisoning and injection of transaminase concentrates. *Staff Meetings of the Mayo Clinic*, 1956, **31** (24), 640-648
20. FLEISHER G.A., WAKIM K.G.: Presence of two glutamic-oxaloacetic transaminases in serum of dogs following acute injury of the liver. *Proceedings of the Society of Experimental Biological Medicine*, 1961, **106**, 283-286
21. FLEISHER G.A., WAKIM K.G.: The fate of enzymes in body fluids – an experimental study : I. Disappearance rates of glutamic-pyruvic transaminase under various conditions. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1963, **61** (1), 76-85
22. FLEISHER G.A., WAKIM K.G.: The fate of enzymes in body fluids – an experimental study : III. Disappearance rates of glutamic-oxalacetic transaminase under various conditions. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1963, **61** (1), 98-106
23. FREEDLAND R.A., KRAMER J.W.: Use of serum enzymes as aids to diagnosis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, 1970, **4**, 61-103
24. FRIEDEL R., MATTENHEIMER H. : Release of metabolic enzymes from platelets during blood clotting of man, dog, rabbit and rat. *Clinica Chimica Acta*, 1970, **30**, 37-46
25. FRIEDEL R., DIEDERICHS F., LINDENA J.: Release and extracellular turnover of cellular enzymes. In Schmidt E., Schmidt F.W., Trautschold I. et al. eds. *Advances in clinical enzymology*, Basel, Switzerland, S Krager Press, 1979, 70-105

26. GEORGE S., ISHIKAWA Y., PERRYMAN M.B., ROBERTS R.: Purification and characterization of naturally occurring and in vitro induced multiple forms of MM creatine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1984, **259** (4), 2667-2674
27. GRÖTSCH H., HADJU P.: Automatic determination of enzyme activities in animal sera with Reaction Rate Analyzer 8600. 1. Comparison of automated and manual methods for transaminases, lactate dehydrogenase and LDH-isoenzymes (alpha-HBDH). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1971, **9** (2), 123-125
28. HAMMER A.S., SIKKEMA D.: Hepatic neoplasia in the dog and cat. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 1995, **25**, 419
29. HOLBROOK J.J., LILJAS A., STEINDEL S.J., ROSSMANN M.G.: The Enzymes - 3rd Edition. *Academic Press*, New-York, 1975
30. HORIUCHI S., KAMIMOTO Y., MORINO Y.: Hepatic clearance of rat liver aspartate aminotransferase isozymes : evidence for endocytic uptake via different binding sites on sinusoidal liver cells. *Hepatology*, 1985, **5** (3), 376-382
31. KAMIMOTO Y., HORIUCHI S., TANASE S., MORINO Y.: Plasma clearance of intravenously injected aspartate isozymes : evidence for preferential uptake by sinusoidal liver cells. *Hepatology*, 1985, **5** (3), 367-375
32. KANEKO J.J., HARVEY J.W., BRUSS M.L.: Clinical Biochemistry of Domestic Animals - 5th Edition. *Academic Press*, New-York, 1997.
33. KATZ M.L., BERGMAN E.N.: Simultaneous measurements of hepatic and portal venous blood flow in the sheep and dog. *American Journal of Physiology*, 1969, **216**, 946-952
34. KELLER P.: Enzyme activities in the dog : tissue analyses, plasma values and intracellular distribution, *American Journal of Veterinary Research*, 1981, **42** (4), 575-582
35. KLOCKE F.J., COPLEY D.P., KRAWCZYK J.A., REICHLIN M.: Rapid renal clearance of immunoreactive canine plasma myoglobin. *Circulation*, 1982, **65**, 1522-1528
36. LEFEBVRE H.P., TOUTAIN P.L., BRET L., RICO A.G., BRAUN J.P.: Compared kinetics of plasma creatine kinase activity in rabbits after intramuscular injection of different preparations of skeletal muscle. *Veterinary Research*, 1993, **24**, 468-476
37. LEFEBVRE H.P., TOUTAIN P.L., SERTHELON J.P., LASSOURD V., GARDEY L., BRAUN J.P.: Pharmacokinetic variables and bioavailability from muscle of creatine kinase in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 1994, **55** (4), 487-493
38. LEFEBVRE H.P., LAROUTE V., BRAUN J.P., LASSOURD V., TOUTAIN P.L.: Non-invasive and quantitative evaluation of post-injection muscle damage by pharmacokinetic analysis of creatin kinase release. *Veterinary Research*, 1996, **27**, 343-361
39. LEHNINGER A.L., NELSON D.L., COX M.M.: Principes de biochimie – 2^{ème} Édition. *Flammarion Médecine*, Paris, 1998

40. LINDENA J., TRAUTSCHOLD I.: Catalytic enzyme activity concentration in plasma of man, sheep, dog, cat, rabbit, guinea pig, rat and mouse - Approach to a quantitative diagnostic enzymology, I. Communication. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1986, **24 (1)**, 11-18
41. LINDENA J., KÜPPER W., TRAUTSCHOLD I.: Catalytic enzyme activity concentration in thoracic duct, liver and intestinal lymph of the dog, the rabbit and the mouse - Approach to a quantitative diagnostic enzymology, II. Communication. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1986, **24 (1)**, 19-33
42. LINDENA J., SOMMERFELD U., HÖPFEL C., TRAUTSCHOLD I.: Catalytic enzyme activity concentration in tissues of man, dog, rabbit, guinea pig, rat and mouse - Approach to a quantitative diagnostic enzymology, III. Communication. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1986, **24 (1)**, 35-47
43. LINDENA J., WITTENBERG H., DIEDERICHS F., TRAUTSCHOLD I.: The decline of catalytic enzyme activity concentration of in vivo ageing erythrocytes of the man, the dog and the rat - Approach to a quantitative diagnostic enzymology, IV. Communication. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1986, **24 (1)**, 49-59
44. LINDENA J., DIEDERICHS F., WITTENBERG H., TRAUTSCHOLD I.: Kinetic of adjustment of enzyme catalytic activity concentrations in the extracellular space of the man, the dog and the rat - Approach to a quantitative diagnostic enzymology, V. Communication. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1986, **24 (1)**, 61-71
45. LOWSETH L.A., GILLET N.A., GERLACH R.F., MUGGENBURG B.A.: The effects of aging on hematology and serum chemistry values in the Beagle dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 1990, **19 (1)**, 13-19
46. MAHY B.W.J.: Action of Riley's plasma enzyme-elevating virus in mice. *Virology*, 1964, **24**, 481-483
47. MAHY B.W.J., ROWSON K.E.K., SALAMAN M.H., PARR C.W.: Plasma enzyme levels in virus-infected mice. *Virology*, 1964, **23**, 528-541
48. MAHY B.W.J., ROWSON K.E.K.: Isoenzymic specificity of impaired clearance in mice infected with Riley virus. *Science*, 1965, **149**, 756-757
49. MAHY B.W.J., ROWSON K.E.K., PARR C.W., SALAMAN M.H.: Studies on the mechanism of action of Riley virus. I. Action of substances affecting the reticuloendothelial system on plasma enzyme levels in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 1965, **122**, 967-980
50. MAHY B.W.J., ROWSON K.E.K., PARR C.W.: Studies on the mechanism of action of Riley virus. IV. The reticuloendothelial system and impaired plasma enzyme clearance in infected mice. *Journal of Experimental Medicine*, 1967, **126**, 277-288
51. MILNE E.M., DOXEY D.L.: Lactate dehydrogenase and its isoenzymes in the tissues and sera of clinically normal dogs. *Research in Veterinary Science*, 1987, **43**, 222-224

52. NAGODE L.A., FRAJOLA W.J., LOEB W.F.: Enzyme activities in canine tissues. *American Journal of Veterinary Research*, 1966, **27 (120)**, 1385-1393
53. NILKUMHANG P., THORNTON J.R.: Plasma and tissue enzyme activities in the cat. *Journal of Small Animal Practice*, 1979, **20**, 169-174
54. PIEK C., VAN DEN INGH T.S.G.A.M., ROTHUIZEN J.: Predictive values of liver enzymes and bile acids for the assessment of liver disease in dogs. *Proceeding*, 1996
55. REICHARD H.: Ornithine carbamyl transferase in dog serum on intravenous injection of enzyme, choledochus ligation, and terachloride poisoning. *Journal of Clinical and Laboratory Medicine*, 1959, **53**, 417-425
56. REYNOLDS B., TAILLADE B., MÉDAILLE C., PALENCHÉ F., TRUMEL C., LEFEBVRE H.P.: Effect of repeated freeze-thaw cycles on routine plasma biochemical constituents in canine plasma. *Veterinary Clinical Pathology*, 2006, **35 (3)**, 339-340
57. RIVERA COLL A., FUENTES ARDERIU X., DIEZ NOGUERA A.: Circadian rythms of serum concentrations of 12 enzymes of clinical interest. *Chemobiology International*, 1993, **10 (3)**, 190-200
58. ROWSON K.E.K., MAHY B.W.J., SALAMAN M.H.: Studies on the mechanism of action of Riley virus - II. Action of substances affecting the reticuloendothelial system on the level of viraemia. *Journal of Experimental Medicine*, 1965, **122**, 983-992
59. SMIT M.J., DUURSMA A.M., BOUMA J.M.W., GRUBER M.: Receptor-mediated endocytosis of lactate dehydrogenase M₄ by liver macrophages: a mechanism for elimination of enzymes from plasma. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, **262 (27)**, 13020-13030
60. STRANDJORD P.E., THOMAS K.E., WHITE L.P.: Studies on isocitric and lactic dehydrogenases in experimental myocardial infarction. *Journal of Clinical Investigation*, 1959, **38**, 2111-2118
61. THORESEN S.I., TVERDAL A., HAVRE G., MORBERG H.: Effects of storage time and freezing temperature on clinical chemical parameters from canine serum and heparanized plasma. *Veterinary Clinical Pathology*, 1995, **24 (4)**, 129-133
62. TOUTAIN P.L., LEFEBVRE H.P., BOUSQUET MÉLOU A.: Relevance of kinetic concepts to interpret a plasma concentration in clinical biochemistry. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 2000, **151**, 643-648
63. TOUTAIN P.L., BOUSQUET MÉLOU A.: I - Plasma clearance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2004, **27**, 415-425
64. TOUTAIN P.L., BOUSQUET MÉLOU A.: II - Plasma terminal half-life. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2004, **27**, 427-439

65. TOUTAIN P.L., BOUSQUET MÉLOU A.: III - Volumes of distribution. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2004, **27**, 441-453
66. TOUTAIN P.L., BOUSQUET MÉLOU A.: IV - Bioavailability and its assessment. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2004, **27**, 455-466
67. VAJDOVICH P., GAAL T., SZILAGYI A., HARNOS A.: Changes in some red blood cell and clinical laboratory parameters in young and old Beagle dogs. *Veterinary Research Communications*, 1997, **21**, 463-470
68. VISSER M.P., KRILL M.T.A., MUIJTJENS A.M.M., WILLEMS G.M., HERMENS W.T.: Distribution of enzymes in dog heart and liver ; significance for assessment of tissue damage from data on plasma enzyme activities. *Clinical Chemistry*, 1981, **27 (11)**, 1845-1850
69. VISSER M.P., KRILL M.T.A., WILLEMS G.M., HERMENS W.T.: Selection of a suitable circulatory model for the plasma clearance and distribution of cardiac enzymes in the dog. *Cardiovascular Research*, 1981, **15**, 35-42
70. WACHSMUTH E.D., KLINGMULLER D.: Reduction of plasma clearance rates and immune response by negative charges: lactic dehydrogenase isoenzymes in normal and LDV-infected mice. *Journal of Reticuloendothelial Society*, 1978, **24**, 227-241
71. WAKIM K.G., FLEISHER G.A.: The fate of enzymes in body fluids – an experimental study. II. Disappearance rates of glutamic-oxalacetic transaminase I under various conditions. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1963, **61 (1)**, 86-97
72. WAKIM K.G., FLEISHER G.A.: The fate of enzymes in body fluids – an experimental study. IV. Relationship of the reticuloendothelial system to activities and disappearance rates of various enzymes. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1963, **61 (1)**, 107-119
73. WATSON A.D.J., LEFEBVRE H.P., CONCORDET D., LAROUTE V., FERRÉ J.P., BRAUN J.P., CONCHOU F., TOUTAIN P.L.: Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs : comparison with other methods and proposed limited sampling strategy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2002, **16**, 22-33
74. WOLF P.L.: Lactate dehydrogenase-6 : a biochemical sign of serious hepatic circulatory disturbance. *Archives of Internal Medicine*, 1985, **145**, 1396-1397
75. ZIMMERMAN H.J., SCWARTZ M.A., BOLEY L.E.: Comparative serum enzymology. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1965, **66 (6)**, 961-972
76. ZINKL J.G., BUSH R.M., CORNELIUS C.E., FREEDLAND R.A.: Comparative studies on plasma and tissue sorbitol, glutamic, lactic and hydroxybutyric dehydrogenase and transaminase activities in the dog. *Research in Veterinary Science*, 1971, **12**, 211-214

Table des Illustrations

| | PAGES |
|--|-------|
| <u>TABLEAUX</u> | |
| - <u>Tableau 1 :</u> Pourcentages d'activité de l'ALAT et de la GLDH dans les tissus du chien [Keller, 1981] | 17 |
| - <u>Tableau 2 :</u> Activités de l'ALAT et de la GLDH dans les tissus et du sérum du chien [Zinkl, 1971] | 17 |
| - <u>Tableau 3 :</u> Activités de l'ALAT et de la GLDH dans les tissus du chien [Lindena, 1986 - III] | 18 |
| - <u>Tableau 4 :</u> Pourcentages d'activité de l'ASAT dans les tissus du chien [Keller, 1981] | 18 |
| - <u>Tableau 5 :</u> Activités de l'ASAT dans les tissus et le sérum du chien [Zinkl, 1971] | 19 |
| - <u>Tableau 6 :</u> Activités de l'ASAT dans les tissus du chien [Lindena, 1986 - III] | 19 |
| - <u>Tableau 7 :</u> Activités enzymatiques de l'ASAT dans les différents lobes du foie chez le chien [Visser, 1981] | 20 |
| - <u>Tableau 8 :</u> Pourcentages d'activité de la LDH dans les tissus du chien [Keller, 1981] | 20 |
| - <u>Tableau 9 :</u> Activités de la LDH dans les tissus et le sérum du chien [Zinkl, 1971] | 21 |
| - <u>Tableau 10 :</u> Activités des isoenzymes de la LDH et proportions des isoenzymes dans les tissus et le sérum du chien [Milne, 1987] | 21 |

| | |
|--|-----------|
| - <u>Tableau 11 :</u> Activités de la LDH dans les tissus du chien [Lindena, 1986 - III] | 22 |
| - <u>Tableau 12 :</u> Distribution intracellulaire des enzymes dans le foie du chien [Keller, 1981] | 22 |
| - <u>Tableau 13 :</u> Valeurs usuelles des activités enzymatiques plasmatiques et sériques des ALAT, ASAT, LDH et GLDH chez le chien [Keller, 1981 ; Zinkl, 1971 ; Lindena, 1986 - I ; Milne, 1987 ; Abdelkader, 1986 ; Zimmerman, 1965 ; Badylak, 1982 ; Fleisher, 1956 ; Caisey, 1980] | 23 |
| - <u>Tableau 14 :</u> Valeurs usuelles des activités sériques des isoenzymes de la LDH chez le chien [Milne, 1987] | 24 |
| - <u>Tableau 15 :</u> Activités enzymatiques plasmatiques chez le chien en fonction de l'âge [Keller, 1981] | 24 |
| - <u>Tableau 16 :</u> Sensibilité des ALAT, ASAT et GLDH pour détecter une affection hépatique chez le chien [Abdelkader, 1986] | 25 |
| - <u>Tableau 17 :</u> Valeurs diagnostiques des ALAT et GLDH pour détecter une affection hépatique [Piek, 1996] | 25 |
| - <u>Tableau 18 :</u> Moyennes des activités enzymatiques des ALAT et GLDH en fonction du degré de nécrose des cellules hépatiques [Abdelkader, 1986] | 26 |
| - <u>Tableau 19 a :</u> Temps de demi-vie après injection d'un homogénat de foie chez le chien [Zinkl, 1971 ; Fleisher, 1956 ; Fleisher 1963 ; Wakim 1963 ; Fleisher 1963 ; Reichard, 1959 ; Stranjörd, 1959 ; Ettinger, 2005] | 31 |
| - <u>Tableau 19 b :</u> Méthodes d'obtention des temps de demi-vie des enzymes hépatiques chez le chien [Zinkl, 1971 ; Fleisher, 1956 ; Fleisher 1963 ; Wakim 1963 ; Fleisher 1963 ; Reichard, 1959 ; Stranjörd, 1959] | 31 |
| - <u>Tableau 20 :</u> Distributions de l'ASAT et de la LDH dans l'espace extravasculaire chez le chien [Bär, 1972 ; Visser, 1981], d'après [Lindena, 1986 - V] | 32 |

| | |
|--|-----------|
| - <u>Tableau 21 :</u> Caractéristiques des animaux utilisés dans le protocole expérimental | 45 |
| - <u>Tableau 22 :</u> Activités enzymatiques du foie utilisé pour obtenir la solution | 54 |
| - <u>Tableau 23 :</u> Activités enzymatiques contenues dans la solution injectée | 54 |
| - <u>Tableau 24 :</u> Volume de solution enzymatique injectée et activités enzymatiques rapportées aux poids des animaux | 54 |
| - <u>Tableau 25 :</u> Paramètres cinétiques de l'ALAT | 60 |
| - <u>Tableau 26 :</u> Paramètres cinétiques de l'ASAT | 61 |
| - <u>Tableau 27 :</u> Paramètres cinétiques de la GLDH | 62 |
| - <u>Tableau 28 :</u> Paramètres cinétiques de la LDH | 62 |
| - <u>Tableau 29 :</u> Principaux paramètres pharmacocinétiques des enzymes étudiées | 63 |
| - <u>Tableau 30 :</u> Activités plasmatiques basales des ALAT, ASAT, LDH et GLDH chez le chien Comparaison des résultats de notre étude avec ceux précédemment publiés | 66 |
| - <u>Tableau 31 a :</u> Temps de demi-vie après injection d'un homogénat de foie chez le chien Comparaison des résultats de notre étude avec ceux précédemment publiés | 67 |
| - <u>Tableau 31 b :</u> Protocoles de détermination des temps de demi-vie chez le chien Comparaison de notre étude avec celles précédemment publiées | 68 |

FIGURES

| | |
|--|-----------|
| - <u>Figure 1 :</u> Paramètres influençant la concentration plasmatique d'un analyte [Lefebvre, 1996] | 27 |
|--|-----------|

- Figure 2 :
 Activités sériques des transaminases après injection intraveineuse d'enzymes purifiées et séparées chez un chien **33**
 [Fleisher, 1956]

- Figure 3 :
 Activités sériques des transaminases après injection intraveineuse d'enzymes purifiées et séparées chez 3 chiens **34**
 [Fleisher, 1961]

- Figure 4 :
 Activités sériques de l'ALAT après injection intraveineuse d'ALAT purifiée et séparée chez un chien **34**
 [Fleisher, 1963 - I]

- Figure 5 :
 Activités sériques de l'ASAT I après injection intraveineuse d'ASAT I purifiée et séparée chez un chien **35**
 [Wakim, 1963 - II]

- Figure 6 :
 Activités sériques de l'ASAT II après injection intraveineuse d'ASAT II purifiée et séparée chez un chien **35**
 [Fleisher, 1963 - III]

- Figure 7 :
 Activités sériques des transaminases après injection intraveineuse d'un homogénat de foie chez un chien **36**
 [Reichard, 1959]

- Figure 8 :
 Activités sériques de l'ASAT après injection intraveineuse d'un homogénat de foie chez un chien **37**
 [Dunn,1958]

- Figure 9 :
 Activités sériques de la LDH après injection IV d'un homogénat de myocarde de lapin chez un chien **38**
 [Stranjörd, 1959]

- Figure 10 :
 Activités sériques des ALAT et ASAT après injection IV de CCl₄ chez un chien **39**
 [Fleisher, 1956]

- Figure 11 :
 Activités sériques des ASAT après injection IV de CCl₄ chez un chien **40**
 [Fleisher, 1961]

| | |
|--|-----------|
| - <u>Figure 12 :</u> Activités sériques des ALAT et ASAT après injection IV de CCl ₄ chez un chien [Reichard, 1959] | 41 |
| - <u>Figure 13 :</u> Activités plasmatiques moyennes de l'ALAT sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle | 51 |
| - <u>Figure 14 :</u> Activités plasmatiques moyennes de l'ASAT sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle | 52 |
| - <u>Figure 15 :</u> Activités plasmatiques moyennes de la GLDH sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle | 53 |
| - <u>Figure 16 :</u> Profil plasmatique de l'ALAT après injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle | 55 |
| - <u>Figure 17 :</u> Profil plasmatique de l'ASAT après injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle | 56 |
| - <u>Figure 18 :</u> Profil plasmatique de la GLDH après injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle | 57 |
| - <u>Figure 19 :</u> Profil plasmatique de la LDH après injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle | 58 |
| - <u>Figure 20 :</u> Profils plasmatiques des 4 enzymes après injection intraveineuse du surnageant d'un homogénat de foie chez le chien 3 | 59 |
| <u>ANNEXES</u> | 91 |
| - <u>Annexe 1 a :</u> Activités plasmatiques de l'ALAT sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle | 77 |
| - <u>Annexe 1 b :</u> Activités plasmatiques de l'ASAT sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle | 77 |
| - <u>Annexe 2 a :</u> Activités plasmatiques de la LDH sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle | 78 |

| | |
|--|-----------|
| - <u>Annexe 2 b</u> : | |
| Activités plasmatiques de la GLDH sur une période de 24 heures chez 7 chiens de race Beagle | 78 |
| - <u>Annexe 3</u> : | |
| Activités plasmatiques de l'ALAT après injection du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle | 79 |
| - <u>Annexe 4</u> : | |
| Activités plasmatiques de l'ASAT après injection du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle | 80 |
| - <u>Annexe 5</u> : | |
| Activités plasmatiques de la LDH après injection du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle | 81 |
| - <u>Annexe 6</u> : | |
| Activités plasmatiques de la GLDH après injection du surnageant d'un homogénat de foie chez 7 chiens de race Beagle | 82 |

Toulouse, 2007

NOM : RIVES

Prénom : Augustin

TITRE : PHARMACOCINÉTIQUE D'ENZYMES HÉPATIQUES CHEZ LE CHIEN

RÉSUMÉ :

Le but de cette étude est de déterminer et de comparer les paramètres pharmacocinétiques des ALAT, ASAT, LDH et GLDH chez le chien sain. Après injection intraveineuse d'un surnageant d'homogénat hépatique de chien, la décroissance des activités enzymatiques plasmatiques a été suivie pendant 18 jours sur un groupe de 7 beagles sains. Les paramètres pharmacocinétiques des enzymes ont été déterminés par une approche non compartimentale.

Les ALAT, ASAT, LDH et GLDH ont respectivement : des volumes de distribution à l'équilibre de 77 ± 15 , 82 ± 51 , 51 ± 8 et 57 ± 9 mL/kg, des temps de demi-vie à l'équilibre de 58.6 ± 8.5 , 21.9 ± 14.8 , 0.9 ± 0.2 et 28.6 ± 14.5 h et des clairances plasmatiques de 1.0 ± 0.2 , 7.5 ± 1.9 , 40.3 ± 11.4 et 2.6 ± 0.4 mL/kg/h.

Une formule permettant de calculer la masse de foie détruite après une lésion hépatique est proposée.

MOTS-CLÉS : FOIE, ENZYME, PHARMACOCINÉTIQUE, CHIEN

ENGLISH TITLE : HEPATIC ENZYME PHARMACOKINETICS IN DOGS

ABSTRACT :

The goal of this study was to determine and compare pharmacokinetic parameters of ALT, AST, LD and GD in healthy dogs. Intravenous injection of a liver supernatant was followed by the measurement of the enzymatic activity in plasma during the following 18 days in 7 beagle dogs. The kinetic parameters were determined by a non compartmental analysis.

Results of the study: the volumes of distribution in steady-state conditions of ALT, AST, LD and GD were respectively 77 ± 15 , 82 ± 51 , 51 ± 8 and 57 ± 9 mL/kg, their half-lives were respectively 58.6 ± 8.5 , 21.9 ± 14.8 , 0.9 ± 0.2 and 28.6 ± 14.5 hours and their plasma clearance were 1.0 ± 0.2 , 7.5 ± 1.9 , 40.3 ± 11.4 and 2.6 ± 0.4 mL/kg/h respectively.

An equation assessing the weight of liver completely destroyed following a period of insult is proposed.

KEYWORDS : LIVER, ENZYME, PHARMACOKINETICS, DOG