PREMIER MINISTRE

COMMISSARIAT A
L'ÉNERGIE ATOMIQUE

CEA-R 3412

ÉTUDE RADIOBIOLOGIQUE DE L'ACTIVITÉ RADIOPROTECTRICE D'UN COMPOSÉ NATUREL IRANIEN : LE " SHIR-KHECHT "

par

Nasser ROUHANIZADEH

Rapport CEA-R 3412

1967
Ga

CENTRE D'ÉTUDES
NUCLÉAIRES DE FONTENAY-AUX-ROSES

CEA-R 3412 - ROUHANIZADEH Nasser

ÉTUDE RADIOBIOLOGIQUE DE L'ACTIVITÉ RADIOPROTECTRICE D'UN COMPOSÉ NATUREL IRANIEN : LE « SHIR-KHECHT »

Sommaire :

Après avoir rappelé les mécanismes primaires de l'action des rayonnements ionisants, les mécanismes possibles de l'action des substances radioprotectrices, les diverses structures chimiques possédant un effet protecteur et les méthodes d'étude de la radioprotection chimique, l'auteur présente les résultats qu'il a obtenus en utilisant un composé naturel iranien : le « Shir-Khecht ». Des essais de ce produit, chez le rat, par diverses voies d'introduction, à dose létale et sublétale ont été effectués. L'effet des radiations, avec et sans protection, a été étudié à l'aide de méthodes histologiques et biochimiques. Le composé essayé possède un pouvoir protecteur; il est, de plus, non toxique et actif par voie orale.

1968 82 pages

Commissariat à l'Energie Atomique — France.

CEA-R 3412 - ROUHANIZADEH Nasser

RADIOBIOLOGICAL STUDY OF THE RADIOPROTECTRIVE ACTIVITY OF A NATURAL IRANIAN PRODUCT : « SHIR-KHECHT ».

Summary :

After reviewing the primary mechanisms of the action of ionizing radiation, the possible mechanisms of the action of radioprotective substances, the various chemical structures having a protective effect and the methods for studying chemical radioprotection, the author presents the results he has obtained with natural iranian product : « Shirt-Kecht ». Tests with this product at lethal and sublethal doses have been carried out on the rat using various means of introduction. The effect of radiation, both with and without protection, has been studied using histological and biochemical methods. The product examined has, in effect, a protective action; it is, furthermore, non-toxic and active when taken orally.

1968 82 pages

Commissariat à l'Energie Atomique — France

Les rapports du COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE sont, à partir du n° 2200 en vente à la Documentation Française, Secrétariat Général du Gouvernement, Direction de la Documentation, 31, quai Voltaire, PARIS VIIe.

The C.E.A. reports starting with n° 2200 are available at the Documentation Française, Secrétariat Général du Gouvernement, Direction de la Documentation, 31, quai Voltaire, PARIS VIIe.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Nasser ROUHANIZADEH

PREMIÈRE THÈSE

" Étude radiobiologique de l'activité radioprotectrice d'un composé naturel iranien : le " Shir-Khecht "

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 31 Janvier 1968 devant la Commission d'Examen

Melle	VEIL	Président
MM.	STOLKOWSKI	Examinateurs
	AVARGUES	
	MARBLE	

A la mémoire de mon père.

Il n'a cessé durant sa vie exemplaire et pleine d'abnégation, de m'encourager et de me guider dans la voie qu'il m'avait choisie.

Son souvenir restera toujours vivant dans ma mémoire, seule expression possible de ma sincère gratitude.

A Mademoiselle VEIL,
Professeur à la Faculté des Sciences de Paris

qui avec beaucoup de bienveillance a bien voulu accepter la présidence de cette thèse.

A Monsieur STOLKOWSKI,
Professeur à la Faculté des Sciences de Paris

qui a bien voulu accepter la direction de cette thèse et m'a accueilli généreusement, dès le premier jour, parmi ses élèves.

A Monsieur AVARGUES,
Professeur à la Faculté des Sciences de Lille,
Adjoint Scientifique au Département de la Protection Sanitaire au Commissariat à l'Energie Atomique

qui a bien voulu accepter d'être rapporteur de cette thèse.

Je prie d'accepter l'expression de ma profonde reconnaissance et de mes remerciements.

A mon Maître,

Monsieur Georges MARBLE
Pharmacien Chimiste de la Marine
Docteur es-Sciences

qui m'a accueilli avec gentillesse, m'a aidé avec spontanéité et, m'a procuré toutes les facilités de travail dans son Laboratoire.

Je tiens à lui prodiguer ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements.

A

Monsieur le Docteur JAMMET,
Chef du Département de la Protection Sanitaire

qui m'a autorisé à travailler dans son département

Monsieur BRESSON,
Adjoint au Chef du Département de la Protection Sanitaire

qui a mis tout en oeuvre pour faciliter mon installation et mon séjour à Fontenay-aux-Roses.

Monsieur le Docteur LE GO,
Chef du Groupe de Radiopathologie Externe

qui a mis à ma disposition tous les moyens de son laboratoire et m'a toujours réservé un accueil chaleureux.

Monsieur GRAS,

qui a organisé avec bonheur mon séjour en France et m'a donné toutes les facilités pour mener mon travail.

Monsieur GAUDE,

qui m'a toujours reçu avec la plus parfaite gentillesse et m'a donné de bons conseils.

Madame BEAU,
Chef du Service de Documentation,

qui a tout fait pour que cette thèse soit imprimée dans les meilleures conditions.

qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

A

Monsieur BREUIL, Médecin-Capitaine

Madame VALLE, Ingénieur

Monsieur GUENET, Docteur-Vétérinaire

Monsieur MAZEAUD, Licencié es-Sciences

qui m'ont prodigué leurs conseils et fait part de leur expérience.

Je tiens également à adresser mes remerciements les plus vifs à

Mademoiselle ABALLAIN

Madame VIGNEAU

Monsieur LAGUERRE

Monsieur VEAU

Monsieur FRAUGER

Monsieur NYS

et tous mes amis, les stagiaires militaires du Laboratoire de Biochimie qui m'ont aidé tout au long de mon travail.

INTRODUCTION

Le développement croissant de l'utilisation de l'énergie atomique, à des fins tant pacifiques que militaires, rend impérative la recherche des méthodes et des moyens les plus efficaces pour protéger les êtres humains contre les effets des rayonnements.

Si la protection physique reste, en général, la meilleure, des techniques de protection contre l'action des rayonnements ionisants sur les êtres vivants, il existe, cependant, des cas où ce mode de protection ne peut être utilisé, en particulier, dans l'emploi des rayonnements dans le traitement thérapeutique du cancer. C'est pourquoi compte tenu du fait qu'il se produit, dans les organismes irradiés, des désordres chimiques et biochimiques importants, a pris naissance, ces dernières années, l'idée de réaliser une protection "in situ", au lieu même où se produit le transfert au milieu biologique de l'énergie des radiations. Cette protection ayant pour but de réduire la sensibilité des tissus organiques à l'action du rayonnement, pourrait être réalisée par la mise en oeuvre d'une prophylaxie médicamenteuse consistant en l'administration, avant l'irradiation, de substances chimiques qui modifieraient, dans un sens favorable, les réactions chimiques radioinduites dans l'organisme irradié.

De nombreux laboratoires ont entrepris la recherche systématique des structures chimiques auxquelles pouvait être attaché un pouvoir protecteur. Mais, après des débuts prometteurs (BACQ 56 et PATT 111) les progrès dans la recherche de ces "radioprotecteurs chimiques" ont été très lents et assez décevants car les meilleurs radioprotecteurs actuellement connus ne pourraient être employés sans risques sérieux, chez l'homme, du fait de leur toxicité.

Nous avions constaté que l'administration à des rats irradiés, d'un produit naturel iranien : le "Schir-Khecht", avait pour conséquence la diminution du nombre des cellules polynucléées du testicule du rat dont l'apparition était provoquée par l'irradiation. (127) C'est pourquoi, il nous a paru utile d'entreprendre une étude approfondie de l'activité radioprotectrice de ce composé.

Après avoir rappelé, d'une part, les méthodes d.étude et les bases théoriques de l'emploi des radioprotecteurs chimiques et, d'autre part, la nature et la composition chimique du "Shir-Khecht" nous donnerons et discuterons les résultats obtenus après administration de "Shir-Khecht", par diverses voies d'introduction, à des rats soumis à une irradiation par le rayonnement γ du cobalt 60. Des essais à dose létale mais également à dose sublétale ont été réalisés. Les méthodes d'étude et les techniques, en particulier biochimiques, qui ont permis d'obtenir ces résultats seront décrites.

CHAPITRE I

DOMMAGE RADIOBIOLOGIQUE ET PROTECTION CHIMIQUE

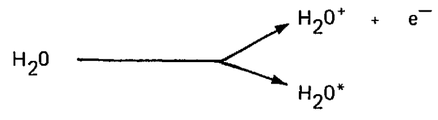
A - INTRODUCTION

Avant d'aborder l'étude proprement dite du "Shir-Khecht" et d'évaluer son éventuelle activité protectrice contre les radiations ionisantes, il nous a semblé nécessaire de rappeler dans leurs grandes lignes, les processus essentiels des effets biologiques des rayonnements, de préciser les théories à partir desquelles l'étude de la radioprotection chimique a pu être entreprise et de passer en revue les principales structures chimiques douées d'un pouvoir radioprotecteur.

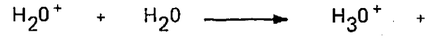
B - MECANISMES PRIMAIRES DE L'ACTION DES RAYONNEMENTS IONISANTS SUR LES ORGANISMES VIVANTS

Pendant longtemps la théorie de l'action directe des radiations ionisantes (absorption directe de l'énergie par les molécules du milieu irradié) a prévalu. Mais depuis les travaux de RISSE (123), de FRICKE (48), de LEA (77) on attribue à l'action indirecte (interaction des molécules avec les produits de la radiolyse de l'eau) un rôle prépondérant dans l'action des rayonnements sur les solutions aqueuses. TARUSOV (144), WEIS (158), BACQ et ALEXANDER (10) ont ensuite pensé que, l'eau étant l'élément de base des tissus vivants, un processus du même type devait intervenir au cours de l'irradiation d'un organisme vivant.

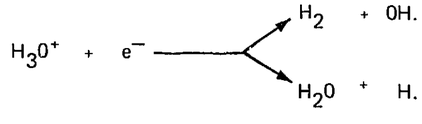
Selon LEFORT (81), ionisation et excitation sont concomitantes et l'on a tout d'abord :



l'ion H_2O^+ réagit de nouveau avec H_2O pour donner un radical hydroxyle et un ion hydroxynium H_3O^+



l'ion H_3O^+ peut capter un électron éjecté lors de l'action sur l'eau, en donnant des radicaux hydroxyle et hydrogène.



Quant à la molécule excitée H_2O^* , elle donne également les mêmes radicaux hydroxyle et hydrogène :

$$H_2O^* \longrightarrow H. + OH.$$

En présence d'oxygène, il se forme un radical hydroperoxyde HO_2.
La réaction peut être directe :

$$O_2 + H_2O \longrightarrow HO_2. + OH.$$

ou indirecte :

- par l'intermédiaire de l'ion O_2^- ($O_2 + e^- \quad O_2^-$)

$$O_2^- + H^+ \longrightarrow HO_2.$$

$$O_2^- + H_2O \longrightarrow HO_2. + OH.$$

par l'intermédiaire du radical H.

$$O_2 + H. \longrightarrow HO_2.$$

Des réactions secondaires interviennent ensuite (ionisations, réactions ions - radicaux, recombinaison de radicaux) conduisant à la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui peut réagir à nouveau avec les radicaux.
On peut avoir les réactions suivantes :

$$OH. + e^- \longrightarrow OH^-$$

$$OH. + OH. \longrightarrow H_2O_2$$

$$HO_2. + H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

$$HO_2. + HO_2. \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$HO_2. + OH. \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$H_2O_2 + OH. \longrightarrow H_2O + HO_2.$$

$$H_2O_2 + HO_2 \longrightarrow H_2O + O_2 + OH.$$

L'action des radicaux libres OH. et HO_2. sur les molécules complexes constituant les milieux biologiques peut

- soit transformer des doubles liaisons en liaisons simples :

- soit rompre des liaisons simples :

$$R-H + HO_2. \longrightarrow R-O-O-H + H.$$

Dans les deux cas, il se forme un nouveau radical libre. Ce radical libre peut induire des réactions en chaîne et l'on peut donc avoir des processus de polymérisation ou des processus de dépolymérisation.

La formation des radicaux libres par action directe des rayonnements sur les molécules organiques existe également et l'on peut avoir :

$$RH - e^- \longrightarrow R + H^+$$

$$R. + O_2 \longrightarrow R-O-O.$$

$$R-O-O. + R. \longrightarrow R-O-O-R$$

$$R-O-O. + R-O-O. \longrightarrow R-O-O-R + n\ O_2 \quad ..., \text{etc}$$

On obtient finalement des peroxydes, c'est ce qui se passe dans l'action des rayonnements sur les lipides conduisant à la formation d'hydroperoxydes d'acides gras.

Il résulte de ces théories que l'énergie des radiations est transférée à la matière vivante et qu'elle provoque la mise en route de réactions chimiques. Ces réactions peuvent entraîner des modifications de certaines macromolécules d'importance biologique élevée et ce sont ces modifications qui pourront engendrer des lésions observables et peut être entraîner la mort de l'organisme irradié.

C - MECANISMES POSSIBLES DE L'ACTION DES SUBSTANCES RADIOPROTECTRICES

Des théories sur les processus initiaux d'action des rayonnements ionisants dérivent les principales conceptions actuelles sur les mécanismes possibles d'action des substances radioprotectrices.
Nous avons vu le rôle particulièrement actif des radicaux libres. Le principe de base, dans la recherche de composés radioprotecteurs, sera de provoquer la réduction du nombre des radicaux dans l'espoir de diminuer, par voie de conséquence, le dommage biologique lié à la formation et au développement des réactions en chaîne.

La réduction du nombre des radicaux libres pourra être obtenue

a) en s'attaquant à l'oxygène

- en provoquant un abaissement de la pression partielle de l'oxygène au niveau des tissus.
- en réduisant le transport, par le sang, de l'oxygène (formation de carboxyhémoglobine ou de méthémoglobine).
- en faisant agir des réducteurs (cystéine, glutathion) qui absorberont l'oxygène.
- en inhibant les enzymes respiratoires tissulaires.

b) en augmentant la résistance du substrat

- certaines substances pourraient s'unir au substrat : le complexe formé résistant mieux à l'action des radiations.
- des composés chimiques pourraient participer au métabolisme normal en favorisant la régulation de ce métabolisme perturbé par l'irradiation.

c) en mettant en compétition la substance radioprotectrice avec les substances sensibles de l'organisme vis à vis des radicaux libres.

Le mécanisme compétitif soutenu par BACQ (10,5), par DOHERTY (34) est le plus probable : Une molécule biologique MH est atteinte par les radiations, il se forme des radicaux libres :

$$MH - e^- \longrightarrow M. + H^+$$

$$MH + HO. \longrightarrow M. + H_2O$$

Le radioprotecteur PH intervient alors en empêchant les radicaux M. de réagir entre eux :

$$PH + M. \longrightarrow MH + P.$$

$$M. + O_2 \longrightarrow M-O-O.$$

$$M-O-O. + PH \longrightarrow M-O-O-H + P.$$

BARRON (12) explique l'action des aminothiols par ce mécanisme :

$$2\ R-SH + 2\ HO. \longrightarrow R-S-S-R + 2\ H_2O$$

$$2\ R-SH + 2\ HO_2. \longrightarrow R-S-S-R + 2\ H_2O_2$$

$$2\ R-SH + H_2O_2 \longrightarrow R-S-S-R + 2\ H_2O$$

La liaison protecteur - substrat a été étudiée par ELDJARN (42). Les aminothiols se combineraient avec des protéines contenant des groupes SH (étude effectuée à l'aide d'un marquage au soufre 35).

$$\text{Protéine} + CH_2-S^*-S^*-CH_2 \rightleftharpoons \text{Protéine}-S-S^*-CH_2 \quad CH_2-S^*H$$

$$CH_2 \quad {}_B^{a}CH_2 \qquad CH_2 \quad {}^{+}CH_2$$

$$NH_2 \quad NH_2 \qquad NH_2 \quad NH_2$$

D - STRUCTURES CHIMIQUES POSSEDANT UN POUVOIR RADIOPROTECTEUR

Bien qu'une classification chimique des radioprotecteurs soit difficile à établir, on peut cependant rassembler les différents composés qui ont été étudiés en quelques grands groupes, à savoir :

- Les composés aminés et soufrés (aminothiols, thiocarbamates, dérivés de l'isothiourée, etc...)
- Les composés soufrés non aminés (thiols, sulfures)
- Les composés aminés (amines, acides aminés)
- Les cyanures et les nitrites
- Les dérivés alcooliques et phénoliques
- Les composés inorganiques.

et des composés divers n'entrant pas dans les groupes précédents et dont l'hétérogénéité ne leur permet pas d'être classés en groupes distincts.

1) Composés aminés et soufrés

a) Aminothiols ou mercaptoamines NH_2-R-SH

Le premier corps de ce groupe ayant révélé des propriétés radioprotectrices a été découvert par BACQ et ses collaborateurs, en 1951, (56,10,5,9) il s'agit de la cystéamine ou 2-mercaptoéthylamine $NH_2-CH_2-CH_2-SH$. De nombreux sels de mercaptoéthylamine ont été utilisés, le nicotinate et l'ascorbate semblent les plus actifs. L'injection par voie intraveineuse doit être effectuée 15 à 30 minutes avant l'irradiation. L'action protectrice de la cystéamine est élevée mais sa toxicité est forte et par suite la marge d'utilisation est faible. De plus, son efficacité est de courte durée. On a donc cherché à modifier la structure de la cystéamine tout en conservant les groupes supposés actifs -SH et -NH2. L'allongement de la chaîne carbonée n'apporte pas grand chose ; la substitution de radicaux alkyles ou aryles sur les carbones ou sur l'azote conduit à des dérivés inactifs ; la substitution sur le soufre et la double substitution sur le soufre et sur l'azote se traduit par une chute très sensible du pouvoir protecteur.

b) Aminodisulfures

Le composé le plus important de ce groupe, est la cystamine qui se transforme, in vivo, sous l'action de la glutathion-reductase du foie, en cystéamine.

c) Dithiocarbamates

Le dithiocarbamate d'ammonium et les dérivés N substitués du dithiocarbamate de sodium présentent des propriétés protectrices nettes ainsi que le diméthyldithiocarbamate de diméthylammonium et le diéthyldithiocarbamate de diéthylammonium. Les propriétés radioprotectrices des thiocarbamates semblent liées au rôle de complexants qu'ils peuvent jouer vis à vis de certains ions métalliques tels que le cuivre, le fer, en empêchant ces derniers d'engendrer des réactions d'oxydation en chaîne.

d) Dithiooxamides

Certains dérivés substitués des dithiooxamides sont actifs ou modérément actifs.

e) Composés hétérocycliques du groupe thiazole

Quelques dérivés du thiazole, du benzothiazole, de la thiazoline, de la thiazolidine ont une grande activité protectrice mais leur toxicité est également élevée. L'action des composés de groupe est basée sur l'hypothèse qu'ils donnent en se décomposant dans l'organisme des aminothiols.

f) Isothiourée et ses dérivés

C'est dans ce groupe que l'on trouve les composés les plus actifs en matière de protection chimique. Le plus actif est l'AET (2 aminoéthylisothiouronium). On explique l'action des dérivés de l'isothiourée par le phénomène de transguanidisation. Un remaniement interne conduirait à la formation d'un composé cyclique instable servant d'intermédiaire pour la transformation des dérivés de l'isothiourée en mercaptoguanidine dans lesquels le groupement -SH est libre.

g) Mercaptoguanidines

Les mercaptoguanidines sont très importants et très actifs. Les plus actifs sont le MEG (mercaptoguanidine) et le MPG (mercaptopropylguanidine).

h) Guanidodisulfures

Ils sont formés à partir des mercaptoguanidines, le plus actif est le GED (guanidoethyldisulfure)

i) Acides aminés

Deux acides aminés à groupement -SH ont révélé une forte activité radioprotectrice, ce sont : la cystéine et le glutathion.

2) Composés soufrés non animés

a) Mercaptans

Les mercaptans ou thiols organiques n'ont pratiquement pas d'effet protecteur.

b) Thioglycols et thioalcools

Certains composés tels que le BAL ont de légères propriétés protectrices.

c) Thioacides

Pratiquement pas radioprotecteurs.

d) Sulfures et disulfures

Les sulfures et disulfures non aminés ne sont pas radioprotecteurs.

e) Sulfoxydes et sulfones

Seul le diméthylsulfoxyde a une action marquée, certains sulfoxydes ont une légère action, quant aux sulfones, elles n'ont pas d'activité protectrice.

f) Thiosulfates organiques

Les thiosulfates organiques sont modérément radioprotecteurs. On pense qu'ils se décomposent dans l'organisme en donnant des aminothiols.

3) Composés aminés non soufrés

a) Aminoacides

Seuls les acides aminés soufrés ont une efficacité réelle.

b) Amines

L'action protectrice des amines est supérieure à celle des aminoacides. On suppose que les amines pourraient provoquer une hypoxie tissulaire et complexer les ions des éléments de transition qui sont, en général, des initiateurs de réaction en chaîne. Les amines les plus actives sont l'histamine et la sérotonine (5 hydroxytryptamine). La sérotonine est un des meilleurs radioprotecteurs connus mais le mécanisme de son action n'est pas encore élucidé.

c) Diamines

Seuls la propylènediamine et l'agmatine ont une action significative.

d) Dérivés de la guanidine

La diphénylguanidine, la créatine et la créatinine ont un léger effet protecteur.

e) Dérivés de pyrimidine

L'uracile et la cytosine ainsi que certains de leur dérivés se sont révélés actifs.

f) Dérivés de l'aminopropiophénone

La PAPP et ses dérivés agiraient par production de méthhémoglobine.

4) Cyanures et nitriles

L'activité protectrice des cyanures et des nitriles semble liée à la possibilité qu'ils ont d'inhiber les enzymes tels que la cytochrome oxydase qui régissent les oxydations intracellulaires, mais, en plus de cette intervention dans les systèmes transporteurs d'électrons, certains pensent qu'ils produisent directement l'hypoxie des tissus en faisant rapidement décroître la tension d'oxygène dans les tissus.

5) Alcools et glycols

L'alcool éthylique provoque une dépression respiratoire pouvant expliquer un certain effet protecteur. Le propylèneglycol a le même effet, les autres glycols sont trop toxiques.

6) Phénols

Certains dérivés phénoliques ont une action radioprotectrice dont on n'explique pas le mécanisme. On peut remarquer que les composés actifs ont, en général, une fonction cétonique à laquelle serait peut être due l'action protectrice de ces composés (diminution de la consommation d'oxygène par les tissus).

7) Composés inorganiques

Les cyanures ont déjà été étudiés. Les nitrites agiraient comme co-substrat de la catalase. Le chlorure d'ammonium agirait en produisant une acidose métabolique. L'eau lourde, le soufre colloïdal, le chlorure de cobalt, le sulfate de magnésium aurraient une légère valeur protectrice.

8) Composés divers

Certains anesthésiques locaux, des hypnotiques, des sédatifs, des analgésiques, des tranquillisants, des oestrogènes ont été essayés, aucun d'entre eux n'a révélé de propriétés radioprotectrices importantes.

E - METHODES D'ETUDE DES RADIOPROTECTEURS

Deux groupes de méthodes sont utilises pour evaluer l activité protectrice éventuelle de composés chimiques :

- l'expérimentation biologique
- l'essai sur modèle

1) Expérimentation biologique

L'expérimentation biologique consiste en l'étude des effets biologiques produits sur des animaux irradiés avec et sans l'administration préalable d'un composé chimique dont on recherche le caractère radioprotecteur.

Ces expérimentations sont effectuées, le plus généralement, à dose d'irradiation létale, c'est-à-dire que l'on irradie les animaux de telle façon que les témoins non protégés meurent en totalité et l'on observe les résultats obtenus dans le groupe des animaux traités.

Le critère de mortalité n'est bien sûr valable qu'à dose létale, dans les autres cas, il faudra avoir recours à des tests biologiques liés au dommage subi par l'organisme irradié.

Dans les deux cas : irradiation à dose létale et à dose sublétale, il faudra, de toute façon, réaliser un certain nombre d'essais préliminaires :

- d'ordre physicochimique, afin de déterminer la nature du solvant dans lequel on pourra dissoudre le composé que l'on veut étudier ainsi que les propriétés physicochimiques des solutions obtenues (solubilité, concentration, pH, etc...)

- d'ordre toxicologique, afin d'établir la dose toxique du produit essayé. On détermine, généralement, la dose létale 50 % (DL 50/7 jours) qui donne une valeur approximative de la limite de toxicité du produit et permet de fixer les doses utilisables en radioprotection.

- d'ordre pharmacodynamique, afin de rechercher la voie d'introduction la plus favorable à la distribution du composé dans l'organisme des animaux en expérience. La voie intrapéritonéale a été la plus utilisée. L'injection par voie sous cutanée, par voie intramusculaire et surtout par voie intraveineuse présente des avantages dans certains cas. Cependant bien qu'il soit difficile d'établir des bilans exacts la voie orale est de loin la méthode la meilleure car ce n'est que administré par cette voie qu'un produit pourrait être réellement utilisé en pratique.

La représentation concrète de l'action d'un protecteur, à l'aide des essais biologiques à dose létale, peut se faire de diverses façons :

a) DL 100

On évalue le plus souvent l'activité des radioprotecteurs en irradiant les administrations du composé à essayer à une dose telle que tous les témoins meurent dans les trente jours qui suivent l'irradiation (DL 100/30 jours). Le nombre des éventuels survivants dans le groupe des protégés traduit l'effet protecteur du produit expérimenté.

b) Courbes de mortalité et de survie

Une meilleure représentation des résultats de l'essai consiste en l'établissement de la courbe de mortalité ou de la courbe de survie en fonction de la dose d'irradiation ou en fonction du temps qui s'écoule après l'irradiation. Cette dernière courbe permet d'évaluer la durée de la survie due au radioprotecteur.
On calcule le temps moyen de la survie (TS 50) et on considère qu'un composé augmentant le TS 50 de 5 jours ou plus encore permettant à des animaux de survivre au delà de 30 jours présente des propriétés radioprotectrices.

c) Facteur de réduction de dose (DRF)

Le facteur de réduction de dose est le rapport de la DL 50/30 jours pour les animaux traités par le protecteur et celle des animaux témoins.

$$DRF = \frac{DL\ 50\ /\ 30\ \text{jours (traités)}}{DL\ 50\ /\ 30\ \text{jours (témoins)}}$$

Plus l'effet protecteur est grand, plus le DRF est grand.

d) Efficacité et efficience

Pour comparer l'action des divers produits essayés et, juger si ceux-ci sont efficaces du point de vue de la radioprotection, la détermination du DRF semble suffisante, mais il faut tenir compte de la quantité de produit utilisée. Le produit ayant même DRF qu'un autre mais agissant à dose plus faible sera plus efficient.

e) Mélange de produits

Lorsque l'on utilise des mélanges de produits radioprotecteurs l'analyse des résultats devient assez complexe. On emploie, en général, ces mélanges en prenant la moitié de la dose toxique de chacun des éléments du mélange et l'on compare ensuite l'activité du mélange à celle de chacun des composants.

Certains composés peuvent agir en synergie, pour d'autres le résultat est simplement une additivité des propriétés de chacun des composants, plus rarement on peut observer une potentialisation, les propriétés radioprotectrices d'un élément non radioprotecteur, employé seul, pouvant être révélées par l'addition d'un autre composé.

f) Durée d'efficacité

Un problème important est celui de la durée pendant laquelle un produit administré par une voie déterminée est efficace car cette durée conditionne le moment de l'administration d'une, et, d'autre part, si elle est très courte, peut faire rejeter, du point de vue pratique, des produits relativement actifs.

L'étude biologique de l'activité des radioprotecteurs, à dose sublétale, est d'un ordre différent, car les critères biologiques qui seront à prendre en considération sont encore difficiles à définir et ne sont pas communément admis. Nous verrons au chapitre IV sur quels critères nous avons basé notre étude et pour quelles raisons nous avons choisi ces critères.

2) Essai sur modèle

L'expérimentation biologique est longue et délicate, elle nécessite l'utilisation de nombreux animaux, c'est pourquoi on a cherché à réaliser des modèles pour lesquels l'action des radiations et le mécanisme d'action des protecteurs seraient sensiblement semblables à ceux que l'on constate chez les animaux. De nombreux modèles (modèle au polymétacrylate, au monoiodacétate, modèle oxygénation, modèle lipidique, enzymatique, etc...) ont été proposés par divers auteurs, mais aucun, à l'heure actuelle, ne semble donner entière satisfaction et il nous paraît bien difficile de se dispenser de l'expérimentation biologique.

F - CONCLUSION

Les composés les plus actifs parmi ceux que nous venons de passer rapidement en revue ont une fonction aminé en β d'un groupement sulfhydrile, ce sont les dérivés de l'isothiourée, en particulier l'AET mais si l'on dresse le tableau des relations physicochimiques de l'AET avec ses produits de dégradation, on obtient la majorité des têtes de séries de composés doués d'un certain pouvoir radioprotecteur. Le domaine des composés actifs est donc relativement limité et malgré les méthodes de "screening" utilisées ces dernières années par de nombreux laboratoires, il semble que l'on ait pas découvert (la sérotonine excepté) de produit nouveau.

CHAPITRE II

LE "SHIR-KHECHT"

Avant de décrire le "Shir-Khecht" et d'étudier sa composition chimique, il faut rappeler que les raisons qui nous ont fait entreprendre ces essais ont leur origine dans les résultats d'une étude que nous avons précédemment réalisée (127).

A - ORIGINE BOTANIQUE DU "SHIR-KHECHT"

Le mot "Shir-Khecht" peut être traduit, d'une manière générale, par le mot français "manne".

Diverses mannes que l'on récolte en Iran, d'origine botanique et géographique différentes possèdent des propriétés médicinales semblables et ont un aspect très voisin, c'est pourquoi une certaine incertitude persiste quant à l'origine exacte du "Shir-Khecht" que nous avons utilisé.

Selon MOGHADAM (103) la manne que les droguistes de Téhéran vendent sous le nom de "Shir-Khecht Chahri", provient des régions montagneuses proches de Téhéran et serait produite par une Polygonacée : l'"Atraphaxis spinosa". Une autre sorte vendue sous le nom de "Shir-Khecht Harati" ou de "Shir-Khecht Khorossani" serait produite par une Rosacée le "Cotoneaster nummularia". PARSA (110) pense au contraire, que c'est le "Cotoneaster nummularia" qui donne le Shir-Khecht de Téhéran.

En fait, le produit brut est, peut être, un mélange de mannes provenant des deux origines.

B - DESCRIPTION ET PROPRIETES DU "SHIR-KHECHT"

Le "Shir-Khecht" se présente sous forme de gouttelettes visqueuses que l'on récolte en raclant les troncs des arbustes. A l'air sec les gouttelettes se dessèchent et se durcissent extérieurement. Le produit que l'on trouve dans le commerce est blanc, de saveur sucrée, il est habituellement mélangé avec de la farine.

Certaines propriétés thérapeutiques ont fait utiliser le "Shir-Khecht" par les médecins iraniens.
MOGHADAM (103) rapporte que cette manne est laxative et purgative. On l'emploie également comme antiphlogistique dans les maladies fébriles. Elle a été utilisée dans le traitement de la rougeole, de la typhoïde, de la bronchite chronique.

Son emploi est absolument empirique et l'on ne sait à quels principes actifs attribuer ses propriétés médicinales.

C - COMPOSITION CHIMIQUE DU "SHIR-KHECHT"

La composition du "Shir-Khecht" semble complexe. Peu de chercheurs ont analysé cette manne et ils ne l'ont fait que partiellement. Nous rapporterons les résultats de ces chercheurs ainsi que ceux des analyses que nous avons effectuées dans le but de chercher quels sont les principes actifs du "Shir-Khecht".

1) Résultats de l'analyse de MOGHADAM

MOGHADAM (103) rapporte, dans sa thèse, les résultats de RABY qui avait trouvé, dans le "Shir-Khecht" 4 % de saccharose, des gommes, de l'amidon et un sucre inconnu qu'il avait appelé "Chirkestite". MOGHADAM rapporte également les résultats de EBERT qui avait trouvé 37 % de glucose, 12 % de saccharose, de l'amidon, des mucilages mais pas de "Chirkestite". Quant à l'auteur de la thèse, il a trouvé environ 10 % de sucres réducteurs mais pas de saccharose. MOGHADAM indique, de plus, que la manne est soluble dans l'eau, que l'extrait sec est de 90 % et que la partie insoluble, soit 10 %, est constitué par de l'amidon de blé.

2) Recherches personnelles relatives à l'analyse du "Shir-Khecht"

Nous avons procédé à la détermination quantitative des protéines totales, des sucres et de nombreux acides aminés.

a) Dosage des protéines totales

α) Méthode d'analyse

Le dosage des protéines totales a été effectué sur le Shir-Khecht dialysé 18 heures à 22°C. contre une solution de ClNa à 6 % par la méthode de LOWRY (86) modifiée de la manière suivante :

On emploie deux réactifs :

Réactif I = réactif de Folin-Ciocalteu

Réactif II = 1 ml de solution A

50 ml de solution B

Solution A = 0,5 ml de $SO_4Cu,5\ H_2O$

100 ml de sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique 0,02 M

Solution B = NaOH N/10 contenant 20 g./l. de CO_3Na_2

L'échantillon à analyser est amené à un volume de 1 ml contenant de 10 à 300 µg. de protéines. Il est additionné de 3 ml de réactif II puis de 0,15 ml de réactif I. La lecture s'effectue au colorimètre photoélectrique à 750 mµ entre 15 min. et 1 heure après le dernier temps opératoire.

β) Résultats

Le "Shir-Khecht" contient peu de protéines. Nous avons trouvé sur plusieurs échantillons de 2,6 à 3,3 % de protéines totales.

b) Dosage des acides aminés

α) Méthode d'analyse

Le dosage des aminoacides a été réalisé par analyse chromatographique automatique selon la méthode de SPACKMAN, STEIN et MOORE (141) modifiée telle qu'elle est décrite par MARBLE,BOULANGER et DUNEAU (95). La séparation et la fixation des acides aminés sont réalisées par passage sur une colonne de résine échangeuse d'ions de type polystyrène sulfonée anionique. L'élution des amino-acides est ensuite effectuée à l'aide d'un mélange de solutions tampons de pH croissant. Le dosage colorimétrique des acides aminés est pratiqué automatiquement par réaction à la ninhydrine. L'automaticité de l'analyse est réalisée par la distribution régulée des mélanges tampons, la récolte au bas de la colonne des éluats, leur mise en mouvement dans un circuit de réaction et d'analyse, leur passage dans des cuves colorimétriques à circulation, l'enregistrement potentiométrique de la variation des densités optiques. Le dispositif analytique est constitué par un ensemble "Autoanalyser Technicon" schématisé sur la figure N° 1.

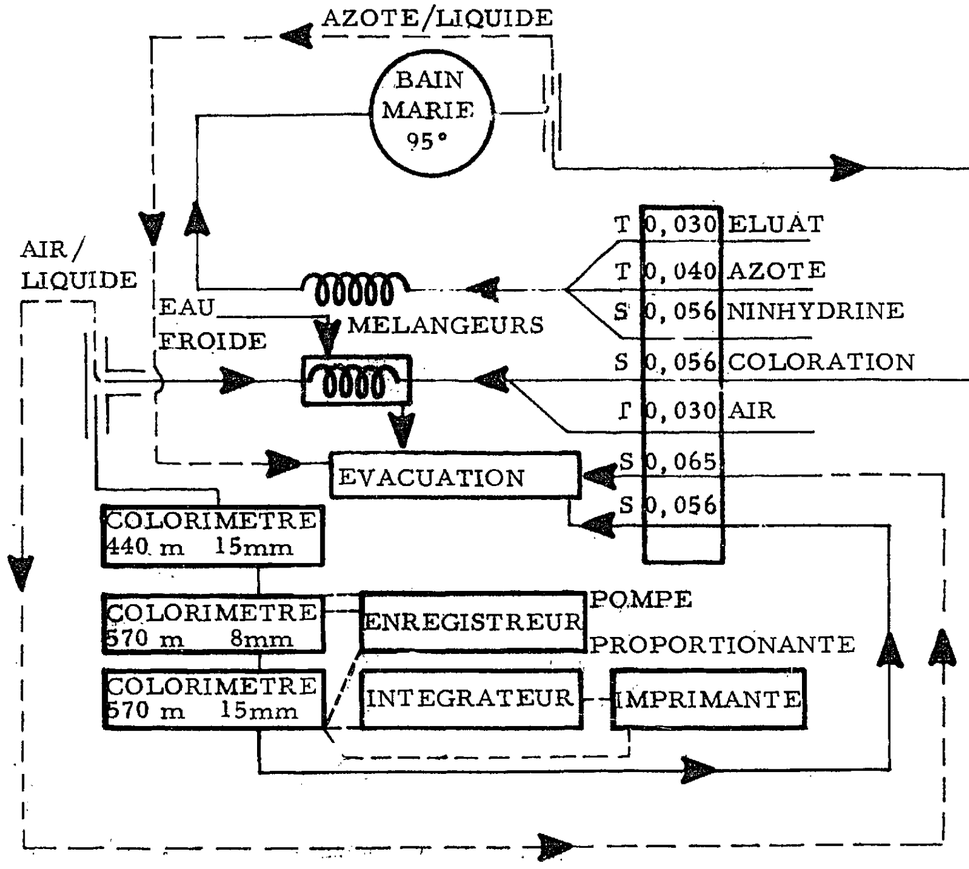


FIGURE n° I

β) Résultats

L'analyse chromatographique de la fraction hydrosoluble du Shir-Khecht montre l'absence pratiquemment totale d'acides aminés libres.

Par contre l'analyse des hydrolysats montre la présence de nombreux amino-acides. L'examen d'un hydrolysat a donné les résultats quantitatifs suivants, exprimés en microgrammes d'acide aminé par gramme de Shir-Khecht.

Acides α aminés neutres

Glycocolle	22,5
Alanine	14,2
Sérine	9,9
Thréonine	10,7
Valine	22,8
Leucine	28,9
Isoleucine	17,0
Phénylalanine	18,3
Tyrosine	9,2
Cystine	0
Méthionine	0
Tryptophane + Histidine	9,0

Acides α aminés acides

Acide aspartique	37
Acide glutamique	87

Acides α aminés basiques

Arginine	20,2
Ornithine	0
Lysine + méthylhistidine	9,0

L'hydrolyse avait été effectuée avec de l'acide chlorhydrique 6 N à 115°C., en ampoule scellée, pendant 48 heures.

Il est à noter, parmi les résultats obtenus dans l'analyse des acides aminés, l'absence totale des acides aminés soufrés (cystine, acide cystéique, méthionine, tarine).

c) Recherche et dosage des sucres

α) Méthode d'analyse

Nous avons effectué l'analyse qualitative des sucres solubles, c'est-à-dire de la fraction des glucides solubles dans l'alcool bouillant, fraction constituée par les oses et les polyoses de faible poids moléculaire, par la méthode de LOISELEUR (85). La séparation des sucres est faite par chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1 pendant 36 heures, à 21°C., dans le mélange de Partridge. Les chromatogrammes sont révélés à l'aide de phtalate d'aniline ou d'urée chlorhydrique.

L'analyse quantitative a été menée, sans fractionnement préalable du Shir-Khecht. La méthode à l'anthrone (104) donne les glucides solubles totaux, libres ou combinés, la méthode de NELSON (105) les sucres réducteurs libres et la méthode de ROE modifiée (58) le fructose libre et combiné. Les recoupements de ces méthodes tels qu'ils sont décrits par EBRAHIZADEH (40) permettent d'obtenir les teneurs en glucose, en fructose et en saccharose. De plus, en ce qui concerne le saccharose, nous avons procédé, à l'aide d'un densitomètre intégrateur, à une estimation quantitative de la coloration de la tache obtenue par chromatographie, par comparaison, à 380 mμ, avec un étalon de saccharose.

β) Résultats

Sur les chromatogrammes la révélation au phtalate d'aniline met en évidence la présence d'un sucre réducteur qui migre en même temps que le glucose. L'urée chlorhydrique révèle deux sucres, l'un quantitativement, le plus important, migre avec le saccharose, et l'autre, avec le fructose. Des chromatogrammes faits à partir de quantités notables de Shir-Khecht n'ont pas révélé la présence d'autres sucres. L'évaluation densitométrique du saccharose sur les chromatogrammes a donné 9 % environ de saccharose, quant au glucose et au fructose, il n'a pas été possible de les évaluer par cette voie.

L'analyse quantitative par les méthodes chimiques a donné une valeur de 8,8 % pour la teneur du Shir-Khecht en sucres totaux ainsi que des teneurs de 5,2 %, 3,4 % et 0,2 % pour respectivement le saccharose, le fructose et le glucose.

d) Teneur en eau

La teneur en eau du Shir-Khecht est très faible. Mesurée par pesée, après séchage à l'étuve à 105°C. jusqu'à poids constant, cette teneur en eau est de 2,83 %.

D - CONCLUSION

Le "Shir-Khecht" est un produit naturel défini, avec quelque incertitude, quant à son origine botanique et, par suite, quant à sa composition. Les résultats quelquefois contradictoires des analyses effectuées par certains chercheurs le prouvent. Les dosages chimiques que nous avons réalisés, apportent quelques renseignements nouveaux, en particulier en ce qui concerne les acides aminés, confirment des résultats déjà trouvés (sucres) mais ne permettent pas d'établir une composition complète et exacte du Shir-Khecht.

De plus, si ce composé est radioprotecteur, on ne voit pas, à l'examen de nos résultats et de ceux antérieurement publiés, à quelle structure chimique définie cette action radioprotectrice pourrait être attribuée. Il se pourrait, donc que l'on ait pas mis en évidence le ou les composés chimiques qui seraient susceptibles d'agir. Il se pourrait, également, que l'analyse chimique ne puisse apporter rien de plus que les résultats que nous avons obtenus, le mécanisme d'action du Shir-Khecht resterait à découvrir et à expliquer.

CHAPITRE III

ACTION PROTECTRICE DU "SHIR-KHECHT" SUR LE RAT IRRADIE A DOSE LETALE

A - INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu au chapitre premier, la survie est le critère le plus fréquemment utilisé pour tester l'efficacité des substances radioprotectrices. Nous avons donc réalisé une série d'expériences dans lesquelles les animaux auxquels du "Shir-Khecht" est administré sont irradiés à une dose telle que tous les animaux d'un groupe témoin doivent mourir dans les trente jours qui suivent l'irradiation.

Les conditions expérimentales relatives aux animaux, à l'irradiation et à l'administration du "Shir-Khecht" permettant de mener à bien cette série d'expériences, seront tout d'abord décrites.

Les courbes de survie des animaux des divers groupes, à des doses différentes et correspondant à divers modes d'administration, seront établies et l'examen de ces courbes permettra d'en déduire si le "Shir-Khecht" a, ou n'a pas, une action protectrice chez le rat, lorsque ce dernier subit une irradiation gamma, à dose létale.

Des essais analogues ont été effectués en injectant de l'AET par voie intrapéritonéale. La comparaison des résultats obtenus pour l'AET et pour le "Shir-Khecht" permettra d'évaluer de manière relative l'effet protecteur du "Shir-Khecht".

Les animaux décédés ont été autopsiés et des examens histologiques ont été effectués, en particulier sur leurs testicules. La comparaison des résultats des examens histologiques des divers groupes avec ceux donnés par les courbes de survie permettra de déterminer si la méthode histologique est à retenir comme méthode d'évaluation de l'activité protectrice.

Le dosage chimique de certains constituants tissulaires et de plusieurs métabolites urinaires a également été effectué dans le but de relier les variations observées à dose létale et à dose sublétale. Les résultats de ces dosages seront étudiés dans le chapitre suivant, relatif à l'irradiation à dose sublétale, de façon à grouper les diverses données biochimiques.

B - CONDITIONS EXPERIMENTALES

1) Animaux

Les animaux utilisés au cours de nos expériences, sont des rats de la souche Wistar C.F. du C.N.R.S. Ces animaux agés de trois mois, en moyenne, pésent entre 250 et 300 grammes. Il s'agit d'animaux conventionnels présentant un bon état sanitaire. Ils sont placés dans un local ayant une climatisation continue à 22°C. ± 1°C et une hygrométrie à 50 %.

La nourriture distribuée en comprimés correspond à la formule suivante :

Humidité	13 %
Matières cellulosiques	6 %
Matières minérales	7,5 %

Protéines brutes	17 %	Vitamine K	1,8 mg/kg
Matières grasses	4 %	Vitamine E	12,5 mg/kg
Vitamine A	6800 U.I/kg	Acide folique	0,15 mg/kg
Vitamine D_3	2600 U.I./kg	Acide nicotinique	12 mg/kg
Vitamine B_1	1,5 mg/kg	Acide PAB	0,3 mg/kg
Vitamine B_2	3,6 mg/kg	Chlorhydrate de choline	218 mg/kg
Vitamine B_6	2,4 mg/kg	Inositol	0,6 mg/kg
Vitamine B_{12}	0,036 mg/kg	Pantothénate de calcium	14,4 mg/kg

L'eau à pH 5 est distribué ad libitum.

2) Irradiation

L'irradiation des animaux est réalisée à l'aide d'une source de cobalt 60 de 2000 curies environ. Le débit d'exposition correspondant à l'isodose du plan de distribution est de 25 roentgens par minute.

Les rats sont placés dans des boîtes cylindriques, en plexiglass, tournant autour de leur axe de sorte que l'irradiation soit totale et homogène. (cf figure 2). La mesure de l'exposition est faite à l'aide d'une chambre d'ionisation et le calcul de la dose absorbée a nécessité une dosimétrie sur cadavre de rat, par la méthode au sulfate ferreux et par chambre d'ionisation.

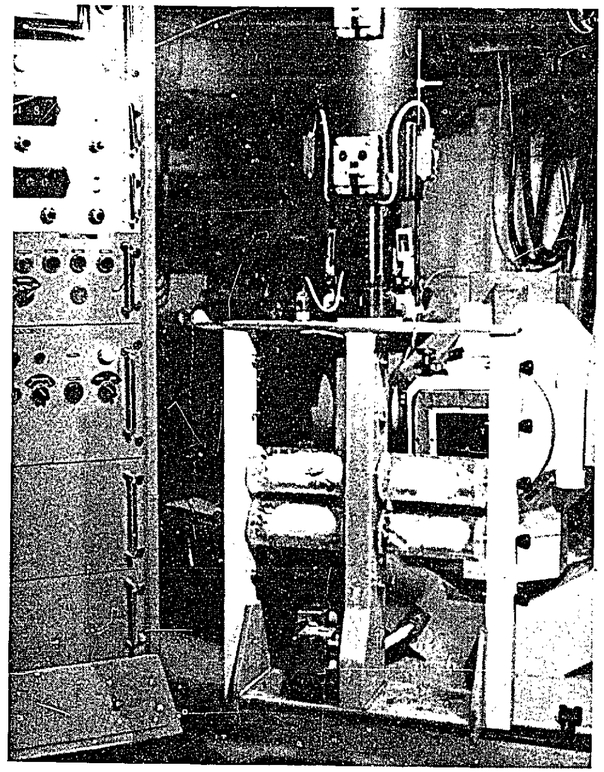


FIGURE n° 2

3) Administration du Shir-Khecht

Le "Shir-Khecht" est administré aux animaux, soit par voie orale, soit par voie intrapéritonéale, soit par les deux voies à la fois. L'administration a toujours été faite avant l'irradiation : l'injection de la solution de "Shir-Khecht" en ce qui concerne la voie intrapéritonéale étant faite une demi heure avant l'irradiation. L'administration par voie orale a été faite soit pendant les deux jours, soit pendant les dix jours qui ont immédiatement précédé l'irradiation.

La forme employée est, dans tous les cas, soit le produit brut, soit une solution aqueuse, après hydrolyse ou non, avec ou sans purification par dialyse. La fraction alcoolosoluble de la dissolution aqueuse a été également utilisée.

Les quantités d'extraits employées sont, dans tous les cas, rapportées au "Shir-Khecht" brut. Pour les injections intrapéritonéales 0,5 et 1,5 gramme de produit par kilogramme de poids des rats ont été employés. Par voie orale 0,5 gramme par kilog de poids des rats et par jour a été donné aux animaux.

Les animaux irradiés non protégés ont reçu, par voie orale ou par voie intrapéritonéale, un volume de sérum physiologique égal à celui des solutions de Shir-Khecht utilisé.

4) Techniques histologiques

. Sur 100 rats irradiés 20 sont sacrifiés et autopsiés après respectivement 1, 2, 3, 4, 12, 15, 22, 32, 60 et 90 jours, à raison de deux rats par jour. Les rats morts à la suite de l'irradiation subie, sont également autopsiés.

Les testicules des animaux ont été prélevés par paire et fixés dans le liquide de BOUIN (à l'acide acétique) pendant 48 heures puis enrobés en paraffine. Les coupes d'une épaisseur de 6 μ ont été colorées par la méthode à l'Hemalun (Glychemalun de CARRAZI) - éosine - safran.

C - COURBES DE SURVIE

1) Essai à 650 rads du produit brut bouilli

Le premier essai du Shir-Khecht a été effectué en utilisant le produit brut après ébullition. Les quantités employées ont été de 0,5 g. par kg de poids de rat,rapporté au produit brut. L'administration à l'animal a été faite, par voie intrapéritonéale, une demi heure avant l'irradiation. Un groupe de 20 rats a reçu l'injection préalable de Shir-Khecht et un second groupe de 20 rats auxquels l'on n'a pas donné de Shir-Khecht a servi de groupe témoin. Tous les rats ont été irradiés dans les mêmes conditions et la dose absorbée calculée a été de 650 rads. Les courbes de survie des animaux des deux groupes sont données par la Figure 3.

Au trentième jour 35 % des animaux du groupe témoins ont survécu, la dose d'exposition à laquelle ont été exposés les animaux n'étant pas assez élevée. On constate cependant que l'on obtient une survie de 55 % dans le groupe des rats qui ont reçu l'injection de Shir-Khecht. Ce résultat nous a, par conséquent, poussé à continuer les recherches concernant l'étude de l'activité protectrice du Shir-Khecht que cette première expérimentation semble confirmer.

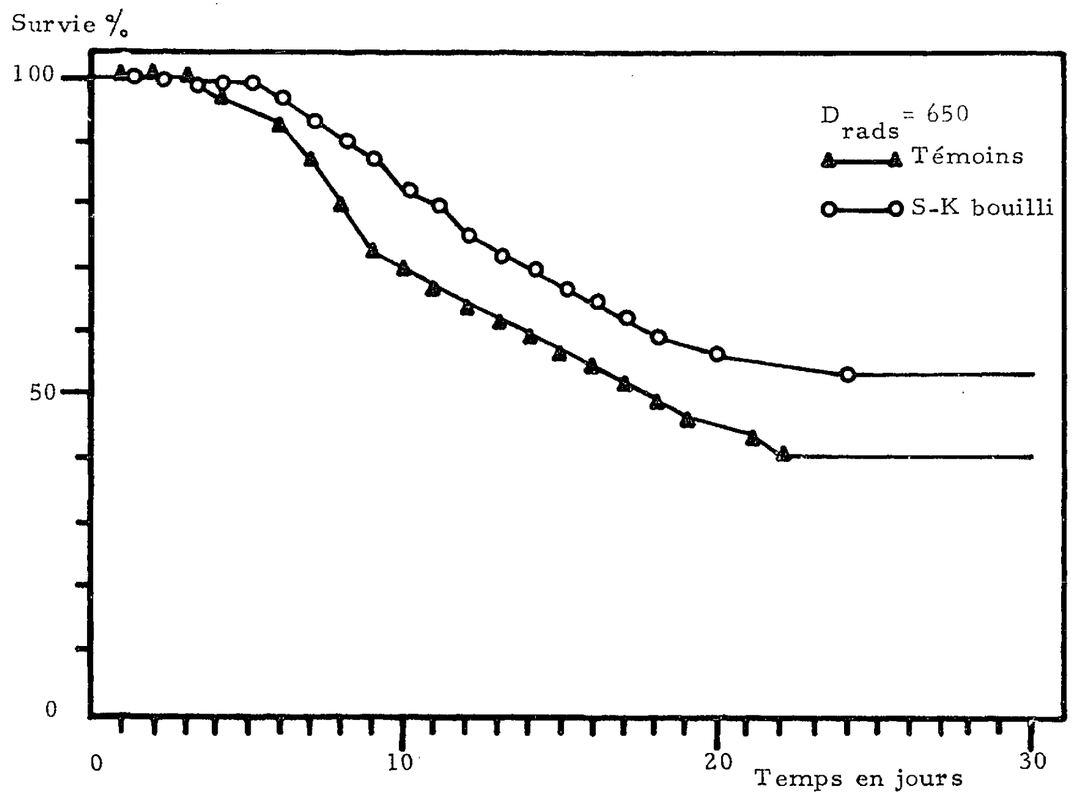


Figure n°3

2) Essai de l'hydrolysat par voie intrapéritonéale

L'hydrolysat a été obtenu par hydrolyse chlorhydrique, en ampoule scellée, avec de l'acide chlorhydrique 6 N, pendant 48 heures à 115° C. Les quantités d'hydrolysat utilisées correspondent à 0,5 g. de produit brut par kg de poids des rats. L'administration a été également faite par voie intrapéritonéale une demi heure avant l'irradiation. Les expérimentations ont été faites sur des groupes de 20 ou de 25 rats et dans tous les cas un groupe d'animaux témoins comportant le même nombre d'animaux et subissant les mêmes manipulations a été employé. Les doses absorbées, que l'on a calculées, sont de 800 rads, 850 rads et 950 rads pour les trois essais effectués avec l'hydrolysat. Les figures montrent les courbes de survie que l'on a obtenues dans les trois cas. Si pour 800 rads on observe encore 8 % de survie dans le groupe des témoins, pour 850 et 950 rads, aucun des animaux des groupes témoins n'a survécu. Dans les mêmes conditions, on observe des survies de respectivement 41 %, 40 % et 20 % au trentième jour après l'irradiation. Ces résultats sont donc nettement significatifs.

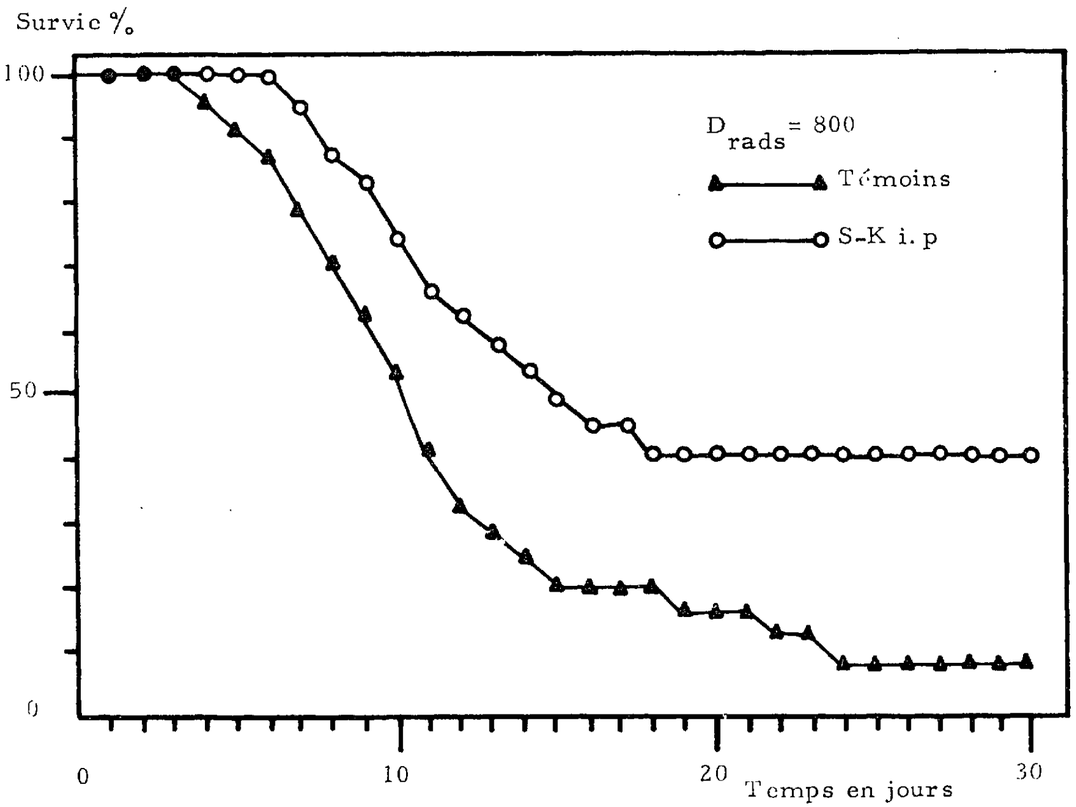


Figure n°4

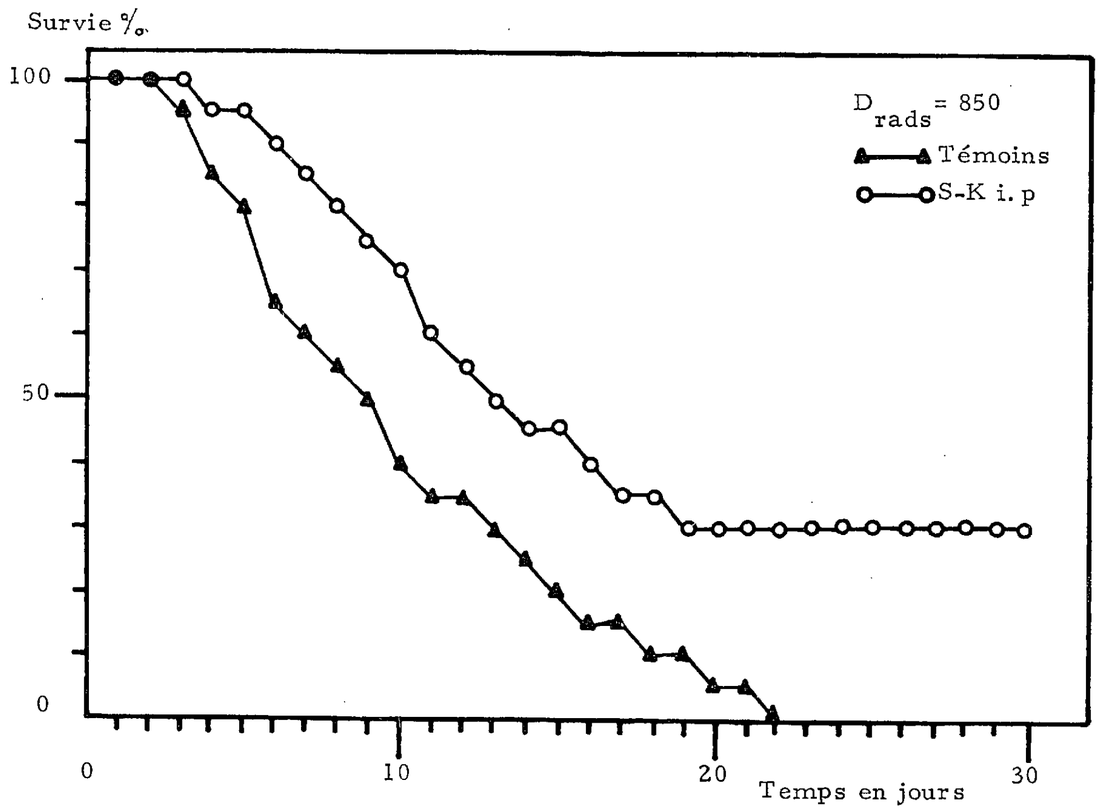


Figure n°5

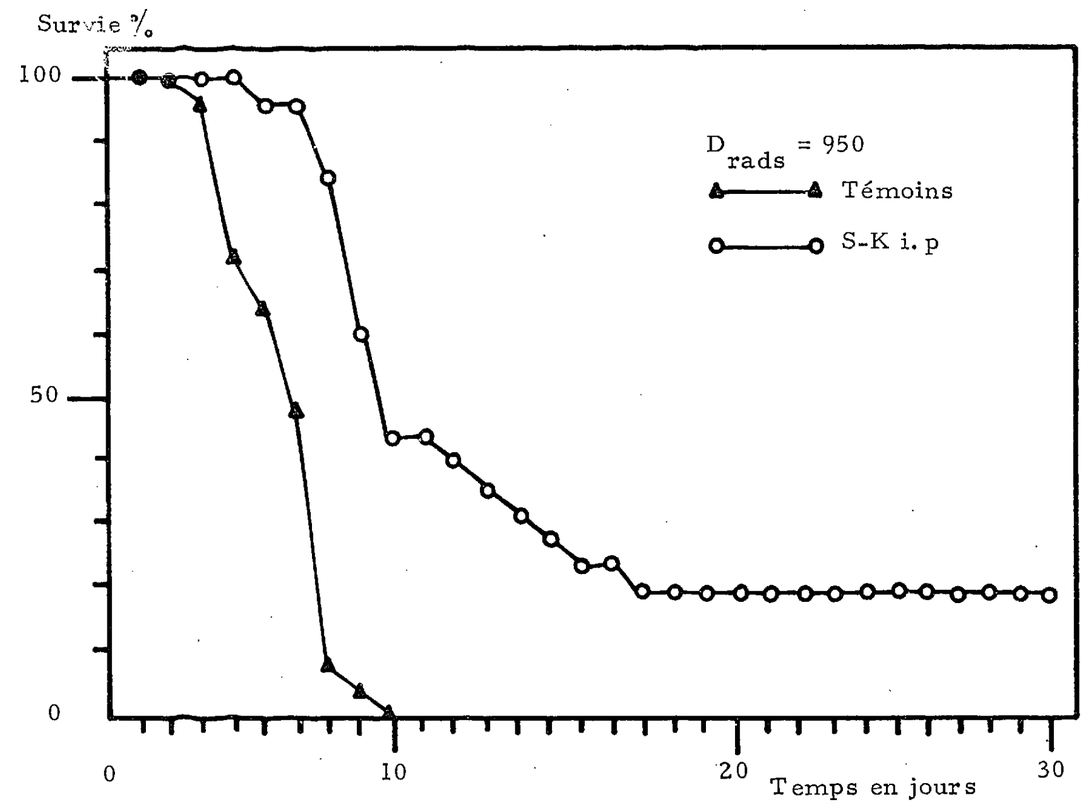


Figure n°6

3) Essai du "Shir-Khecht" après dialyse

Plusieurs essais ont été effectués en utilisant du produit dialysé. Cette dialyse a été réalisée, à la température du laboratoire, pendant 18 heures, contre une solution de ClNa à 6 °/o.

a) Essai par voie intrapéritonéale

Cet essai a été fait dans les mêmes conditions expérimentales que les essais effectués avec l'hydrolysat. Les rats ont été irradiés à 850 rads et 40 °/o des animaux ayant reçu l'injection de "Shir-Khecht" avant l'irradiation, ont survécu (cf figure 7).

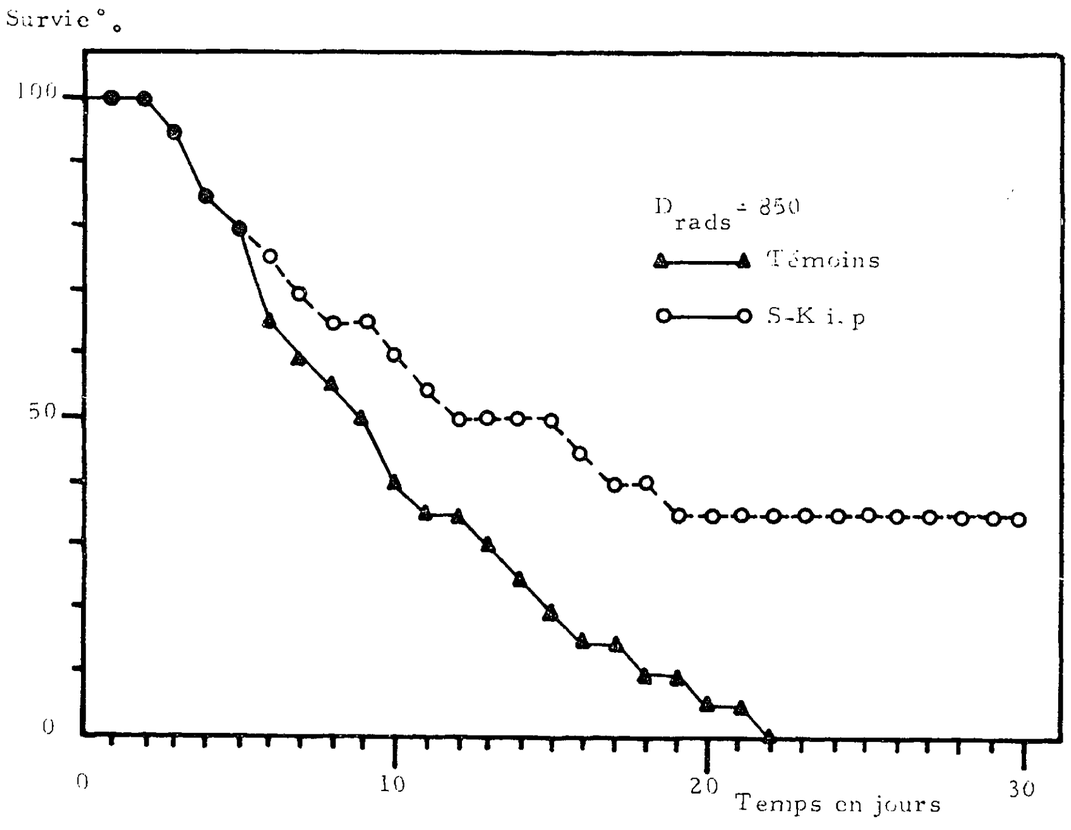


Figure n°7

b) Essai par voie orale

Dans le but de savoir si une activité protectrice pouvait être obtenue en administrant le "Shir-Khecht" par voie orale, nous avons effectué une expérimentation analogue à la précédente, mais en administrant, "per os", pendant les 10 jours précédant l'irradiation du "Shir-Khecht" dialysé, à raison d'environ 0,5 g./jour/kg de poids de rat soit environ 1,25 g. de "Shir-Khecht" pour un rat de 250 g. Nous avons obtenu dans ce cas 35 °/o de survie (cf figure 8). L'intérêt de cette manipulation est grand, car elle montre que le "Shir-Khecht" est actif par voie buccale.

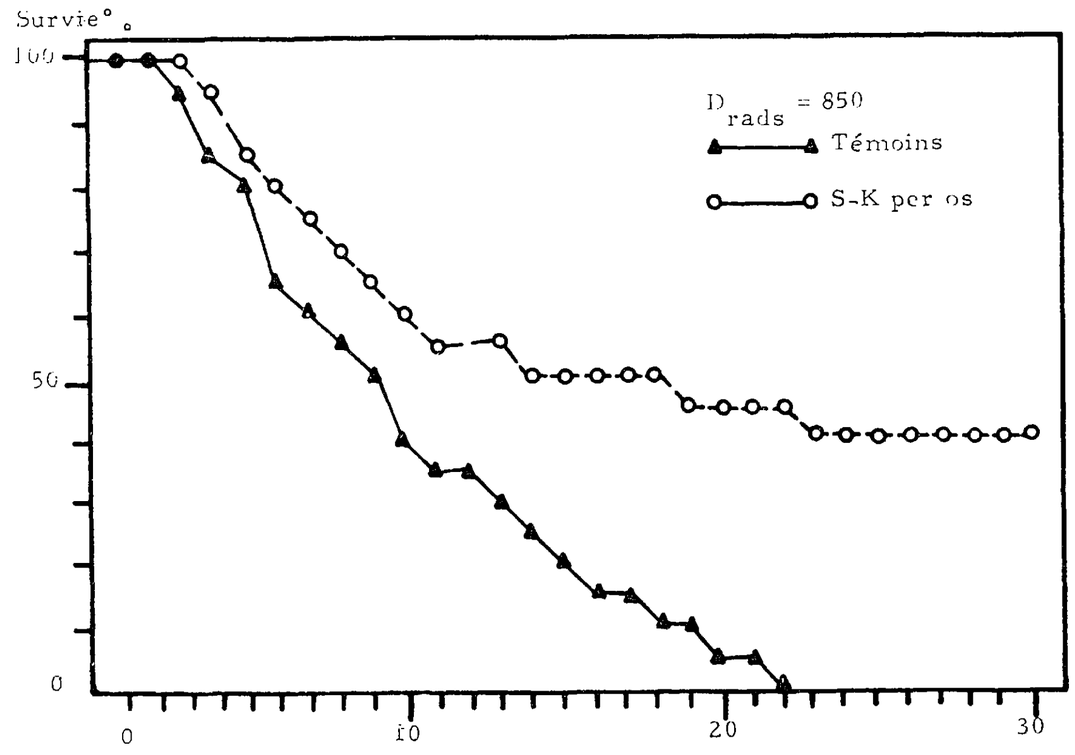


Figure n°8

c) Essai combiné (voie orale+ voie intrapéritonéale)

Les deux administrations précédentes ont été faites simultanément à un groupe d'animaux, de façon à voir s'il se produisait un effet cumulatif. La courbe de survie de la figure 9, montre le résultat obtenu qui est le meilleur de tous ceux que nous avions eu jusqu'ici, c'est-à-dire, 50 % de survie.

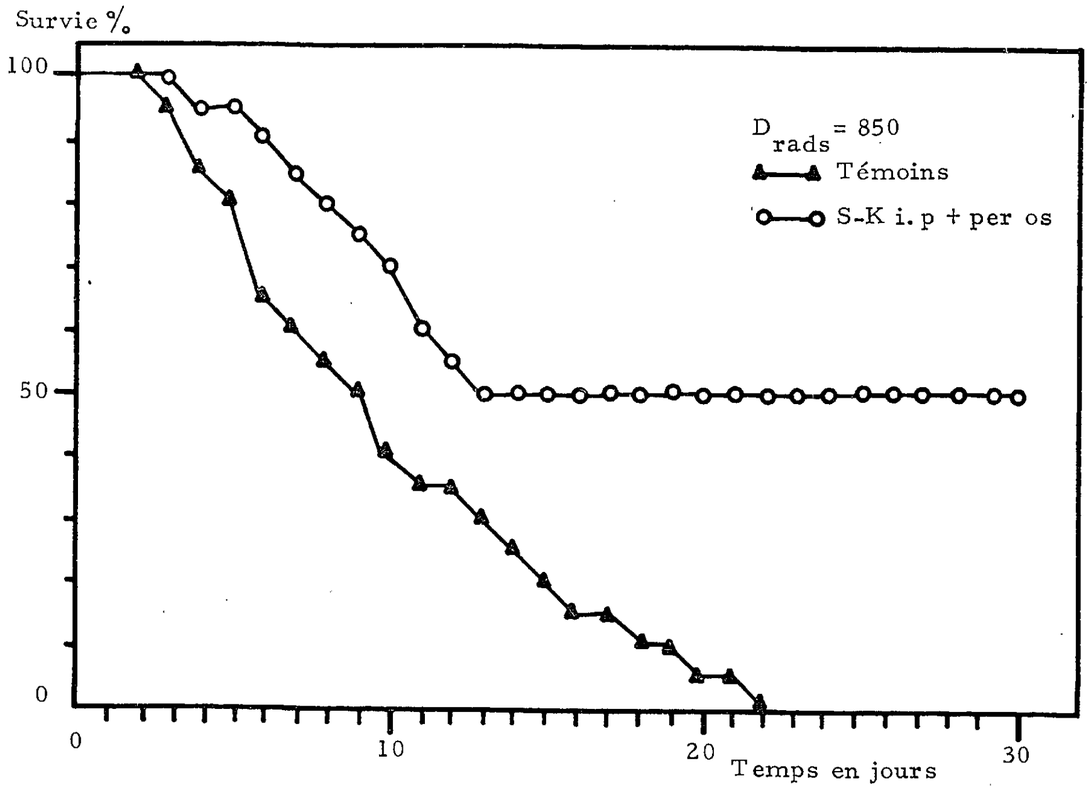


Figure n°9

4) Essai des fractions alcoolo-solubles et insolubles

Ne sachant à quel principe actif rattacher le pouvoir radioprotecteur que nous avons décelé, nous avons séparé les fractions solubles et insolubles dans l'alcool, pour savoir dans laquelle de ces deux fractions se trouve la substance active.

Pour une irradiation correspondant à une dose absorbée de 800 rads, nous avons obtenu 33,3 % de survie dans le groupe des animaux ayant reçu la fraction soluble dans l'alcool, alors que l'on pouvait noter 100 % de mortalité au 24ème jour après l'irradiation dans le groupe où les animaux avaient été traités par la fraction insoluble dans l'alcool.

D - ESSAIS COMPARATIFS AVEC L'A.E.T.

1) Examen toxicologique préliminaire

L'A.E.T. (aminoéthylisothiuronium) est un radioprotecteur chimique qui a été bien étudié et peut servir de test de référence, pour les essais que nous avons effectués avec le "Shir-Khecht". L'A.E.T. est toxique et il est indispensable de faire une étude préalable de toxicité avant de l'utiliser. Dans le but de déterminer la DL 50 aigüe traduisant cet effet toxique chez le rat, nous avons utilisé la méthode dite d''up and down" décrite par DIXON et MOOD (33), appliquée par KIMBALL, BURNETT et DOHERTY chez la souris (66) et par MARBLE et BREUIL chez le rat (96). Nous avons obtenu comme DL 50/24 heures pour l'AET : 271 mg/kg, les limites de confiance à 95 % étant 260 mg/kg et 283 mg/kg.

2) Courbes de survie

Nous avons réalisé avec l'AET les mêmes expérimentations que celles que nous avions effectuées avec le Shir-Khecht. Les rats ont reçu par voie intrapéritonéale 150 mg/kg d'aminoéthylisothiouronium sous forme de chlorhydrate. La quantité d'AET administrée a été calculée de façon à ce que aucun des animaux témoins non irradiés ne meurent par effet toxique dans les trente jours qui suivent l'injection. Les rats irradiés (animaux traités et animaux témoins) ont reçu des doses identiques à celles qu'avaient reçu les rats en expérimentation avec le "Shir-Khecht". Les courbes de survie relatives à ces essais sont rassemblées sur la figure 10.

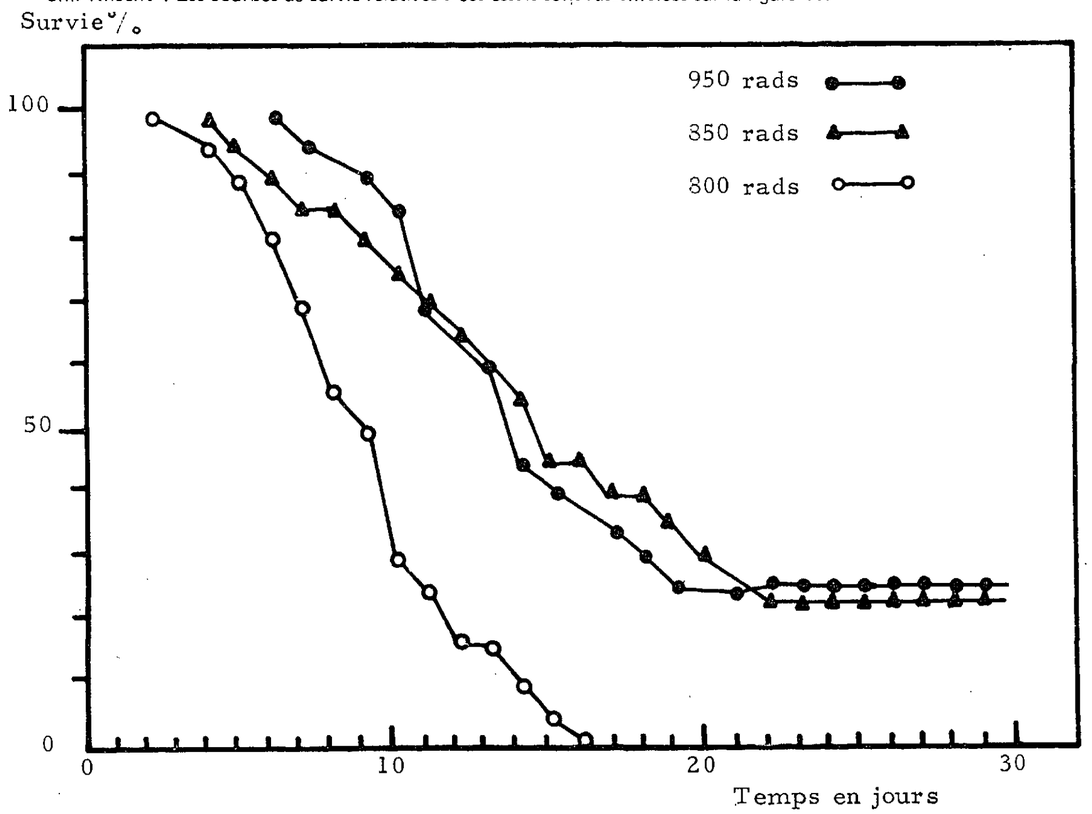


Figure n°10

L'examen des courbes de survie après administration d'AET montre que l'on obtient des résultats assez semblables à ceux obtenus avec le "Shir-Khecht" quant à la mortalité au bout de trente jours après l'irradiation. Les valeurs des pourcentages de survie, dans les différents cas d'irradiation et de protection sont réunies dans le tableau I.

Dose en rads / Nature de l'essai	800	850	950
Témoins non irradiés	100	100	100
Témoins irradiés	8	0	0
Shir-Khecht (hydr.) I.P.	41	40	20
I.P. + per os	53		20
Shir-Khecht (dia.) I.P.		40	
I.P. + per os		50	
per os		35	
AET i.P.	25	24	0

Pourcentage de survie à 30 jours

Tableau I

L'allure des courbes est cependant légèrement différente. On peut noter que la mortalité est plus forte dans les premiers jours pour les animaux traités au "Shir-Khecht" tout au moins pour les irradiations à 800 et 850 rads. On a, en effet, au 5ème jour 2 % de mortalité avec le S-K intrapéritonéal, alors que l'on a 9 % chez les témoins et 0 % avec l'AET. Pour l'irradiation à 850 rads, on a respectivement 15,20 et 10 % par contre, en ce qui concerne l'irradiation à 950 rads on a toujours au cinquième jour après l'irradiation, 5 % seulement de mortalité pour le groupe traité au SK alors que la mortalité pour les animaux traités à l'AET est de 12 % et que la mortalité chez les témoins est de 35 %. On pourrait penser que l'effet du Shir-Khecht sur le syndrome gastrointestinal soit inférieur à celui de l'AET bien que cela ne semble pas valable à 950 rads. Quoiqu'il en soit, on peut envisager l'emploi d'une association Shir-Khecht + AET dont les effets pourraient être supérieurs à ceux des produits employés seuls.

3) Essai de l'association Shir-Khecht - AET

Un essai comparatif AET, Shir-Khecht, association Shir-Khecht a été effectué et a donné les résultats suivants :

	Shir-Khecht	AET	Association	Témoins
Mortalité 5 jours	10 %	5 %	0	5 %
Survie 30 jours	45 %	45 %	50 %	15 %

Tableau 2

Il semble donc que l'association ne donne guère de meilleurs résultats que chacun des produits employés seuls. Peut être que des essais ultérieurs portant sur des quantités variables des deux produits et des concentrations plus élevées donneront des résultats supérieurs, mais on ne peut l'affirmer.

Le fait que des résultats analogues aient été obtenus avec l'AET et avec le Shir-Khecht montre que le Shir-Khecht a bien, en effet, un rôle protecteur contre l'action des rayonnements ionisants, comparable dans une certaine mesure à celui de l'AET, mais il n'est pas possible de conclure quantitativement que le Shir-Khecht est aussi actif que l'AET chez le rat, car les résultats que nous avons obtenus, compte tenu des quantités que nous avons utilisées en fonction de la toxicité de ce produit, sont inférieurs à ceux que l'on obtient généralement chez la souris. Des essais à diverses doses d'AET devraient être effectués, ainsi que des essais avec des quantités variables de Shir-Khecht, de façon à déterminer, de manière rigoureuse, l'efficience des deux produits.

E - COURBES DE POIDS

Un des critères généraux classiques traduisant l'effet des radiations est la perte de poids que subissent les animaux irradiés. Nous avons suivi la variation du poids des rats des divers groupes (témoins irradiés et non irradiés, protégés par l'AET ou par le Shir-Khecht). Nous avons également noté la variation du poids des testicules d'un certain nombre d'animaux sacrifiés dans ce but, ainsi que celui de la rate d'animaux sacrifiés en vue du dosage des acides nucléiques.

1) Poids total du corps

Les courbes de la figure 11 montrent la croissance régulière du poids des animaux témoins non irradiés. Par contre, tous les animaux irradiés, protégés ou non, perdent du poids, cette perte étant moins sensible chez les animaux protégés. Les protecteurs diminuent l'amplitude de la variation de poids mais ne la suppriment pas. Des résultats du même ordre de grandeur sont obtenus avec le "Shir-Khecht" et avec l'AET. On observe chez le rat adulte les mêmes variations mais d'amplitude plus faible.

2) Poids des testicules

La figure 12 donne les courbes de variation du poids des testicules des rats des divers groupes. On voit immédiatement que ces courbes sont similaires à celles que nous avons obtenues en ce qui concerne la variation du poids total du corps.

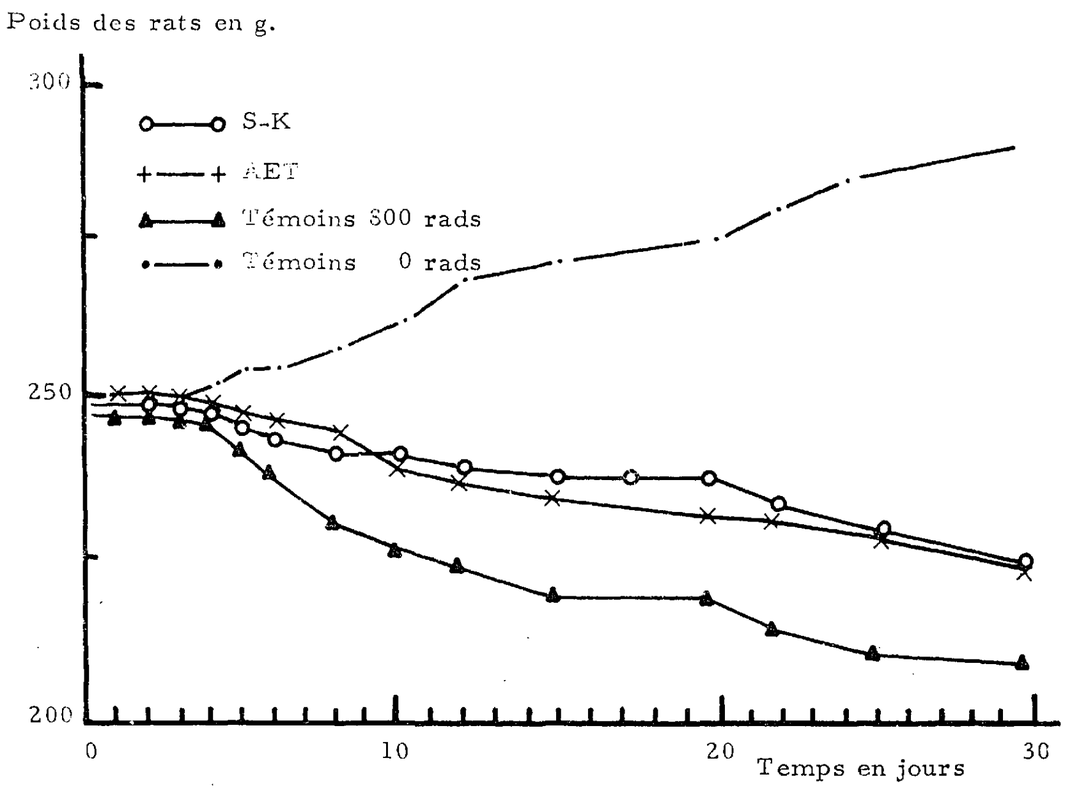


Figure n°11

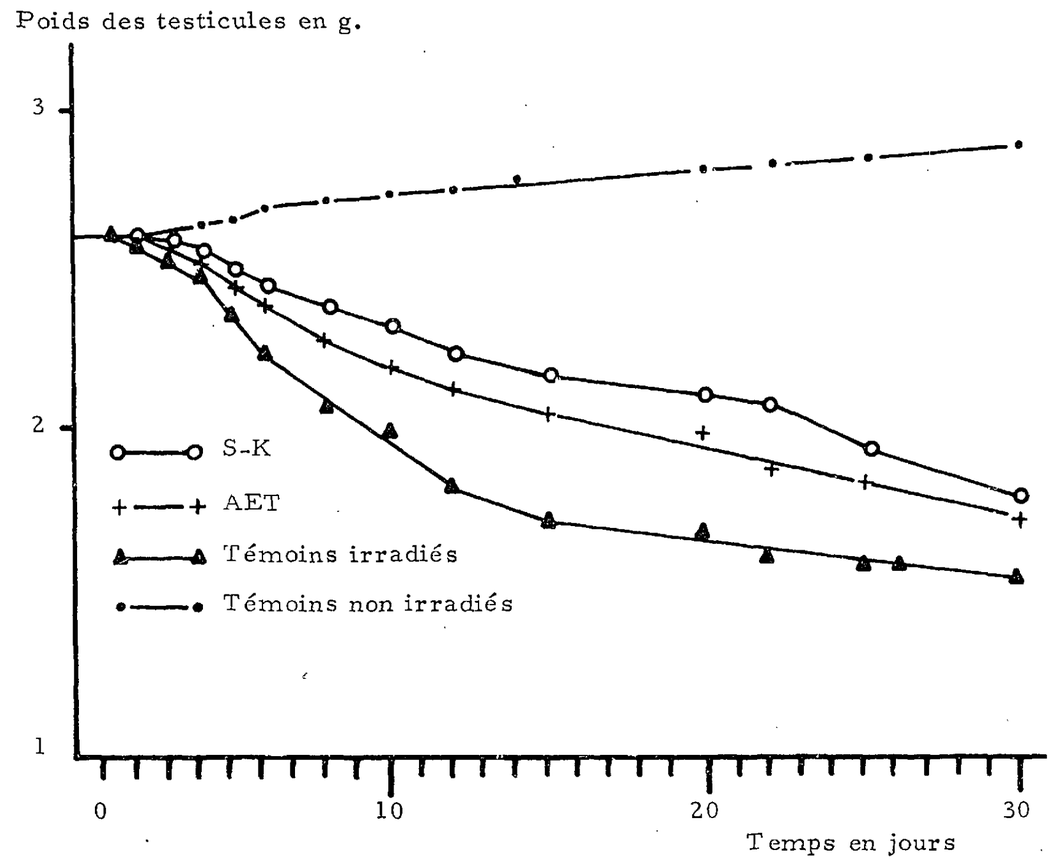


Figure n°12

2) Poids de la rate

Nous avons, dans le but de doser l'acide désoxyribonucléique et les polydésoxyribonucléotides libres dans la rate, sacrifié un certain nombre d'animaux non irradiés et irradiés à différentes doses, à des intervalles de temps différents après l'irradiation. La courbe de la figure 13 traduit la variation en fonction du temps après l'irradiation du poids de la rate rapporté au poids du corps. La dose absorbée calculée était de 800 rads. On constate une chute rapide du rapport atteignant un facteur 4 au bout d'environ 50 heures.

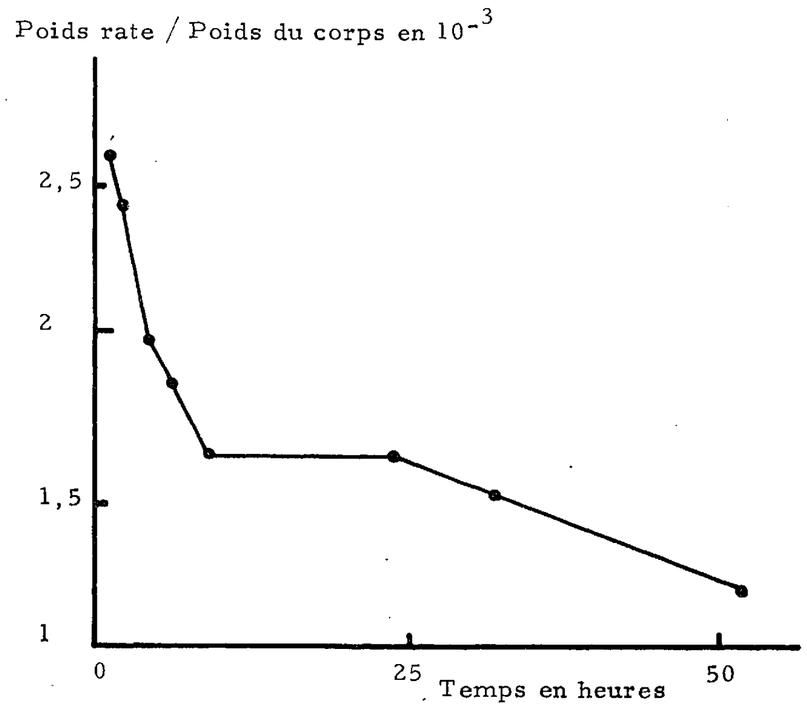


Figure n°13

La valeur du rapport poids de la rate sur poids du corps déterminée sur des animaux sacrifiés 48 heures après l'irradiation et irradiés à des doses comprises entre 0 et 650 rads diminue avec la dose absorbée comme le montre la courbe de la figure 14.

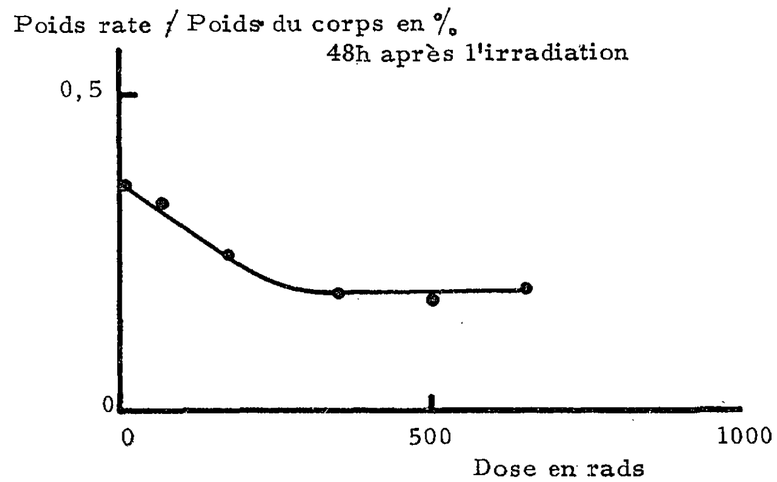


Figure n°14

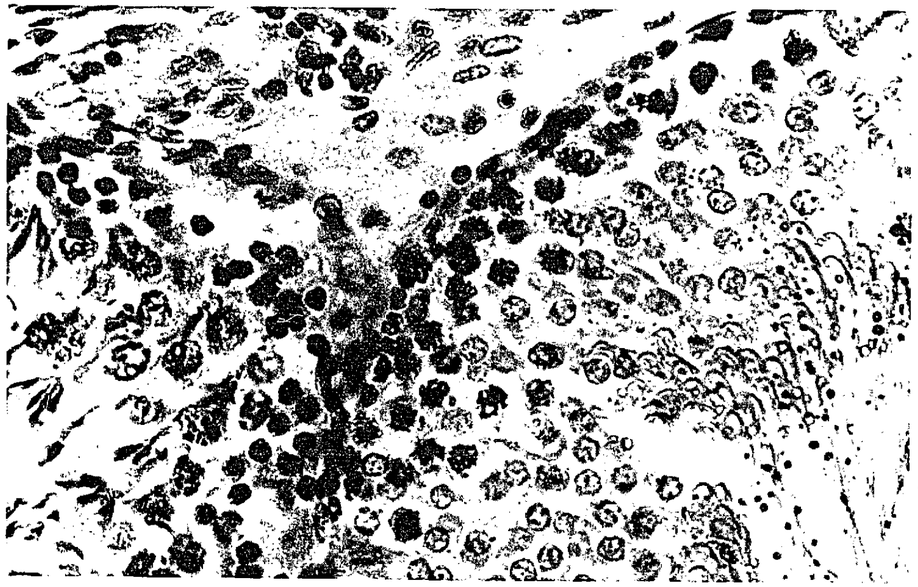
Le calcul du poids de la rate rapporté au poids du corps pour des animaux non irradiés et irradiés à 350 rads, non protégés ou protégés par l'AET ou le Shir-Khecht a donné les résultats suivants :

Témoins (0 rad)	0,32 %
Irradiés 350 rads	0,22 %
350 rads+ AET	0,28 %
350 rads+ Shir Khecht	0,27 %

F - ETUDE HISTOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE DES TESTICULES

1) Spermatogonies

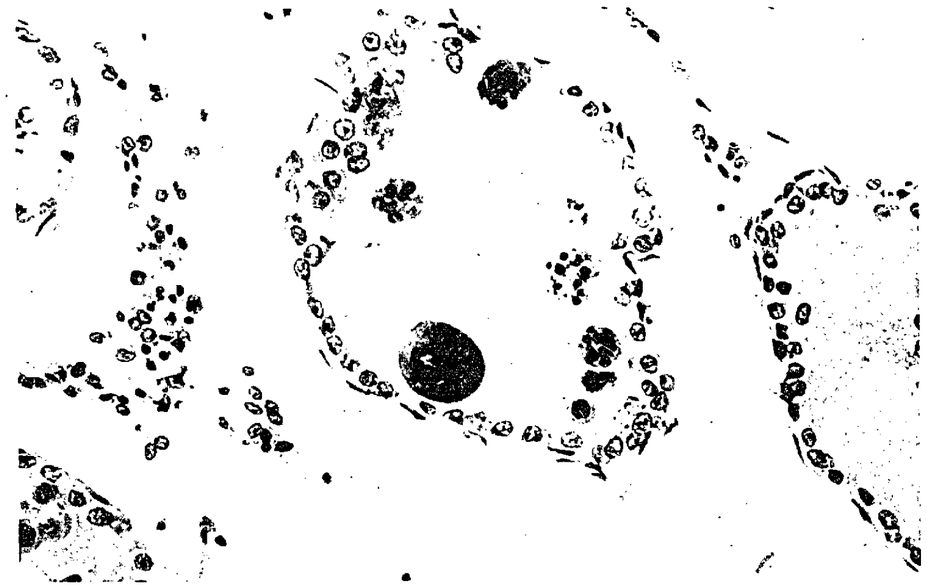
L'étude histologique des testicules montre que ce sont les spermatogonies qui sont de beaucoup les éléments les plus radiosensibles. La figure 15 montre une coupe de tube séminifère de testicule de rat normal non irradié. On peut remarquer sur cette coupe l'agencement régulier des spermatogonies.



Coupe de testicule de rat non irradié

FIGURE n° 15

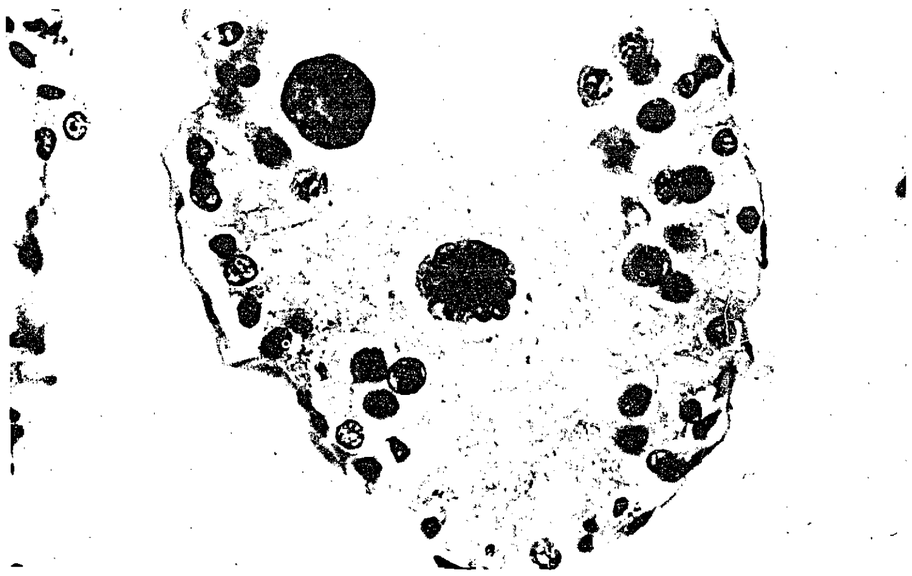
Après l'irradiation, on peut observer au bout de quelques jours, une disparition progressive des spermatogonies qui sont remplacées par des cellules polynucléées. On peut observer ces cellules sur la coupe d'un tube séminifère d'un rat irradié à 800 rads (cf figure 16). Le prélèvement testiculaire ayant été effectué 22 jours après l'irradiation, ces cellules sont très grandes et renferment plusieurs noyaux disposés grossièrement en couronne. La chromatine est très souvent condensée et forme une espèce de croissant.



Coupe de testicule de rat irradié à 800 rads

FIGURE n° 16

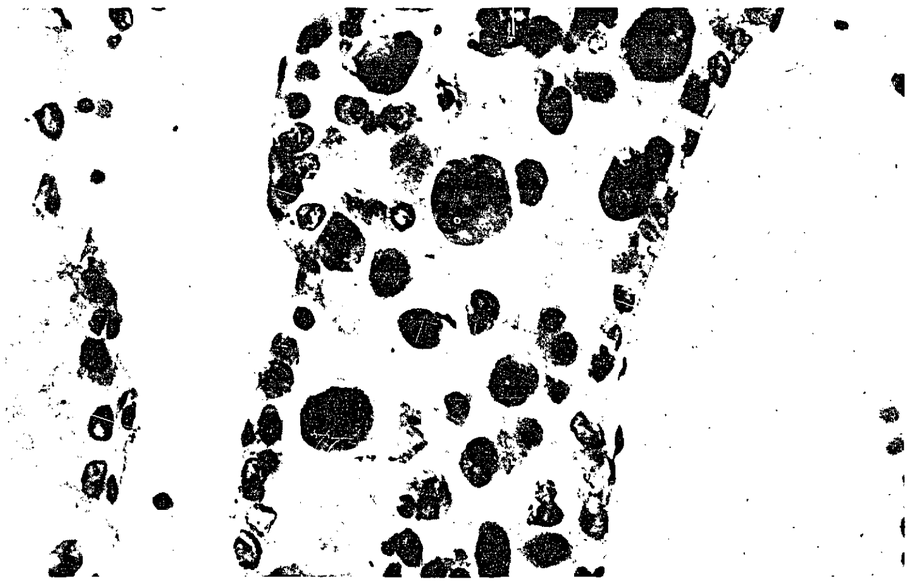
Les coupes de tubes séminifères des testicules des rats protégés par le Shir-Khecht avant l'irradiation montrent un aspect analogue. Les prélèvements ont également été effectués 22 jours après l'irradiation. On peut observer sur la coupe de la figure 17, une diminution importante du nombre des spermatogonies et l'apparition de cellules polynucléées. Le nombre de ces dernières semble être inférieur à celui que l'on observe sur les coupes relatives aux animaux irradiés non protégés.



Coupe de testicule de rat irradié à 800 rads
avec protection par le Shir-Khecht

FIGURE n° 17

Nous avons également effectué des prélèvements testiculaires chez les rats protégés par l'A.E.T., ces prélèvements ont été faits le 22ème jour après l'irradiation, les rats ayant reçu, dans les mêmes conditions expérimentales, la même dose de rayonnement gamma. On peut observer sur la coupe de la figure 18, des cellules polynucléées dont le nombre semble peu différent de celui que l'on obtient lorsque les animaux sont protégés par le Shir-Khecht.



Coupe de testicule de rat irradié à 800 rads
avec protection par l'AET

FIGURE n° 18

Nous avons cherché à chiffrer les variations du nombre des spermatogonies selon la technique de numération qui a été décrite précédemment.

Dans un groupe de rats irradiés à 600 rads, nous avons évalué le nombre des spermatogonies et des cellules polynucléées en fonction du nombre moyen des spermatogonies compté sur des coupes correspondant à des rats normaux non irradiés. Les pourcentages des spermatogonies et des cellules polynucléées, en fonction du temps après l'irradiation, sont donnés par le tableau III.

Date de prélèvement	Spermatogonies % de la normale	Cellules polynucléées en % du taux normal de spermatogonies
J+ 1	58	0
J+ 2	45	0
J+ 3	40	1
J+ 4	35	5
J+ 12	28	45
J+ 15	25	60
J+ 22	18	70
J+ 32	2	85
J+ 60	5	0
J+ 90	48	0

Tableau 3

La figure 19 est la représentation graphique de la variation du nombre des spermatogonies en fonction du temps après l'irradiation.

On peut remarquer sur cette courbe que la diminution du nombre des spermatogonies se fait pendant les trente premiers jours qui suivent l'irradiation, la pente de la courbe devient ensuite positive ce qui traduit un processus de restauration. On retrouve un pourcentage de spermatogonies par rapport à la normale d'environ 50 % au 90ème jour après l'irradiation.

Des numérations analogues ont été effectuées se rapportant aux groupes de rats irradiés à 800 rads avec ou sans protection par l'AET ou le Shir-Khecht.

Les courbes traduisant la variation du pourcentage des spermatogonies par rapport à la normale, dans les trois groupes sont données par la figure 20.

On constate que la chute du nombre des spermatogonies est moins forte pour les animaux protégés. Au trentième jour les pourcentages de spermatogonies sont de 1 %, 8 % et 12 % respectivement pour les animaux irradiés non protégés, protégés par l'AET et protégés par le Shir-Khecht.

Nous avons tenté de réaliser une numération des cellules polynucléées pour traduire l'effet du radioprotecteur. Les valeurs obtenues variant de façon importante d'une coupe à l'autre en ce qui concerne les animaux protégés, il ne nous a pas été possible de retenir cette technique dans l'évaluation des variations produites par l'utilisation des substances protectrices.

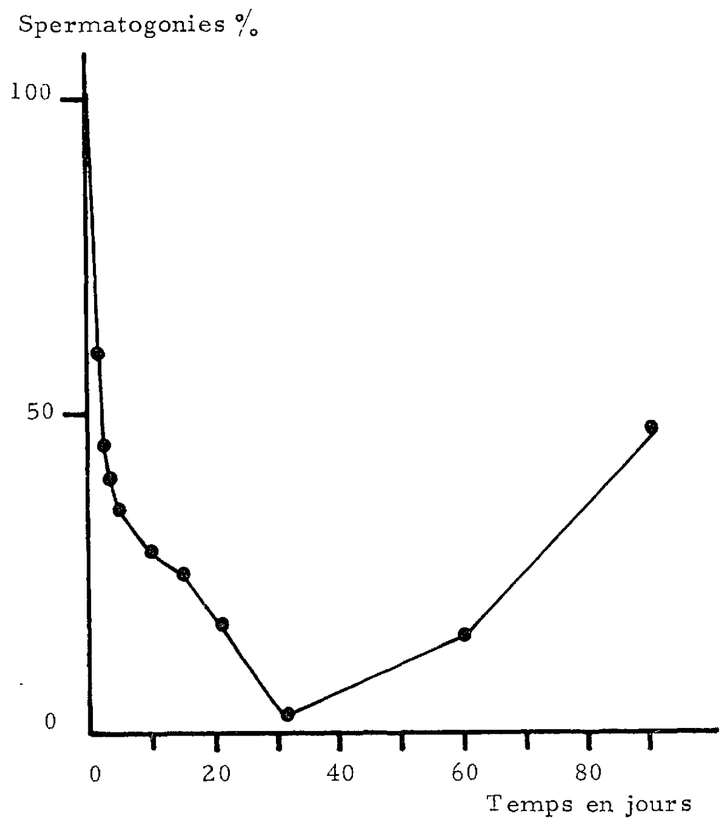


Figure n°19

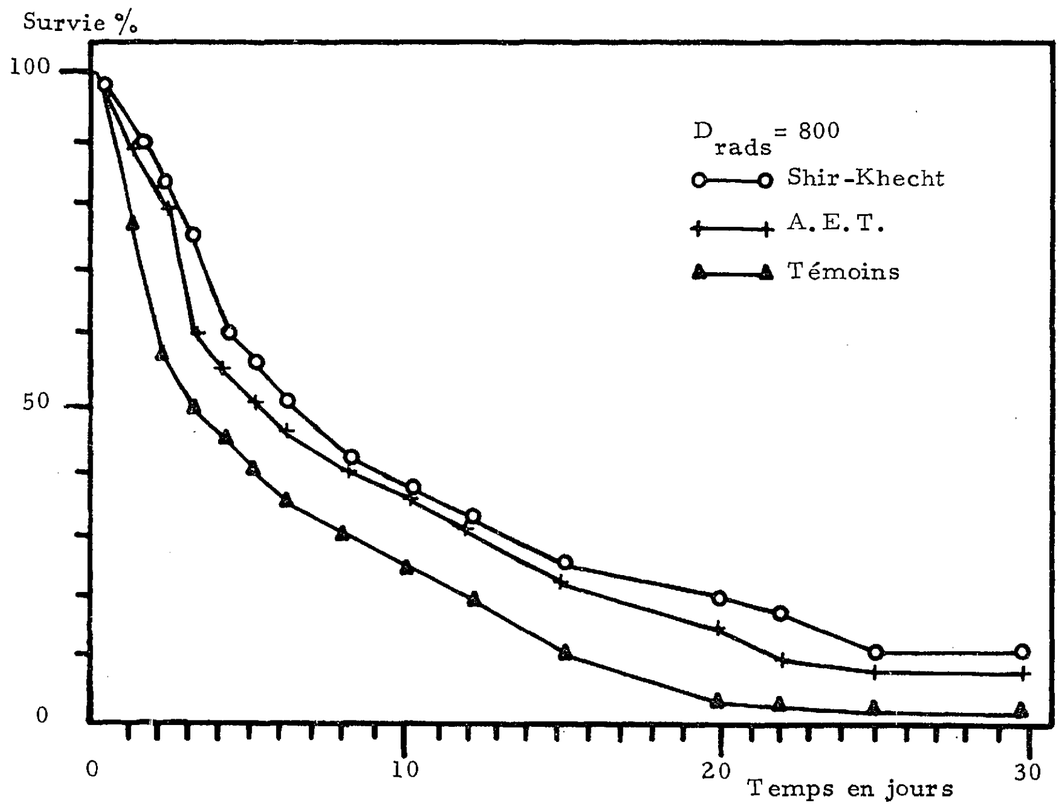


Figure n°20

2) Les autres types cellulaires de l'epithelium séminal

a) Les spermatocytes I et II, les spermatides

Les spermatocytes et les spermatides sont les cellules en voie d'évolution, elles sont donc les plus atteintes après les spermatogonies.

La chromatine de ces cellules est souvent condensée à la périphérie du noyau ménageant un énorme nucléole. Parfois il se produit une division du noyau en éléments de tailles inégales.

Nous avons constaté que dans toutes les coupes provenant des divers groupes d'animaux, les spermatides disparaissent plus vite et totalement alors que, au contraire, les spermatozoïdes restent assez nombreux. Ce résultat est, somme toute, assez logique, compte tenu des durées de vie des différents types cellulaires et du fait que la spermatogénèse est stoppée par l'irradiation.

Nous avons noté également l'augmentation classique du volume du cytoplasme et un grossissement des vacuoles périnucléaires des spermatocytes.

b) Les cellules de soutien de Sertoli

Les cellules de Sertoli sont moins radiosensibles que les cellules précédentes. On les retrouve toujours sur les coupes de tubes séminifères de rats irradiés. Nous avons noté quelquefois des cellules de Sertoli possédant un nucléole deux à trois fois plus gros que la normale, sur des coupes faites à partir de prélèvements de testicules réalisés après le 12ème jour après l'irradiation, en ce qui concerne le groupe des animaux non protégés. (cf figure 21)

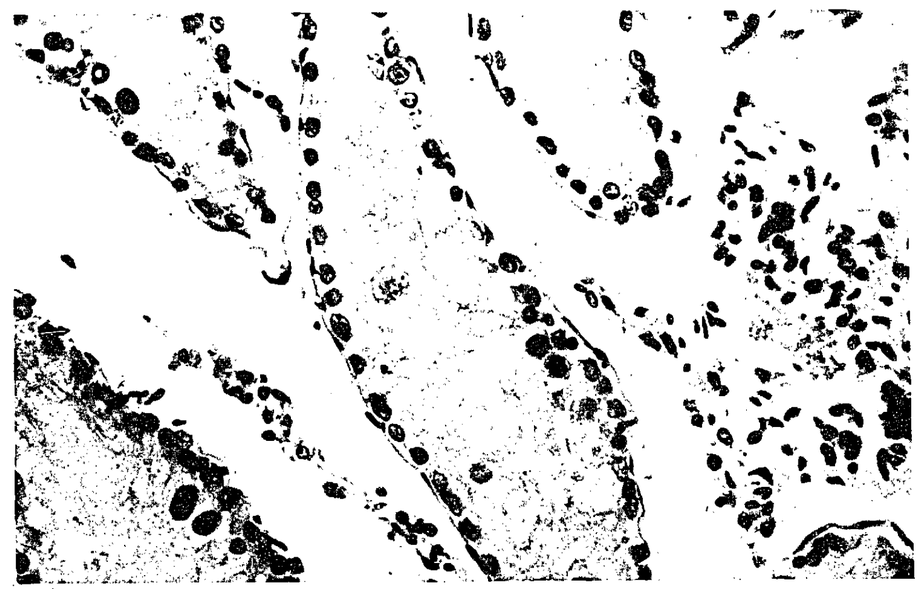


FIGURE n° 21

3) Les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig ne subissent aucune atteinte directe et sont, par suite, les moins sensibles des cellules testiculaires (cf figure 21).

C - CONCLUSION

L'examen des courbes de survie obtenues pour des animaux irradiés à dose létale, avec ou sans administration préalable de Shir-Khecht, montre que, dans tous les cas expérimentaux, il y avait toujours des survivants dans le groupe des animaux ayant reçu le Shir-Khecht. Le pouvoir radioprotecteur, à dose létale, du Shir-Khecht a donc été mis en évidence.

Le pourcentage de survie observé dépend de la dose d'exposition, de la voie d'introduction dans l'organisme et, bien entendu, de la forme sous laquelle le Shir-Khecht est utilisé.

Le Shir-Khecht est actif par voie intrapéritonéale, simplement bouilli, sous forme d'hydrolysat, et également sous forme de solution aqueuse après purification par dialyse. La fraction soluble dans l'alcool est la fraction active, mais il n'a pas été possible de rattacher le pouvoir protecteur du Shir-Khecht à une structure chimique définie, l'analyse chimique du Shir-Khecht n'étant pas suffisamment complète.

Le Shir-Khecht est actif par voie orale et ceci est très important car peu de radioprotecteurs le sont administrés par cette voie, la seule qui puisse vraiment être utilisable facilement.

L'effet protecteur du Shir-Khecht se traduit par une diminution de la perte de poids des rats irradiés. Il en est de même de la variation de poids des testicules et de la rate des rats protégés.

L'examen histologique des testicules a également permis de noter une diminution moins sévère du nombre des spermatogonies dans les testicules des rats protégés par le Shir-Khecht. Il en découle que le nombre des cellules polynucléées qui se forment après l'irradiation est lui-même diminué.

CHAPITRE IV

ACTION PROTECTRICE DU "SHIR-KHECHT" SUR LE RAT IRRADIE A DOSE SUBLETALE. ESSAI D'EVALUATION BIOCHIMIQUE DE LA PROTECTION

A - INTRODUCTION

Les expérimentations effectuées à dose létale ont permis de mettre en évidence une action protectrice du "Shir-Khecht", le critère d'appréciation étant la survie des animaux traités. L'activité de ce produit est-elle également appréciable à dose d'irradiation inférieure à la dose létale ? En d'autres termes, le "Shir-Khecht" a-t-il pour effet une réduction de dose absorbée à dose sublétale ? La réponse à cette question est très difficile car si l'on sait mesurer une dose d'exposition, on ne peut accéder directement à la mesure de la dose absorbée. L'évaluation du dommage biologique n'est possible que par des méthodes biologiques. Encore faut-il trouver des critères biologiques qui soient représentatifs du dommage réellement subi par l'organisme et qui varient proportionnellement à ce dommage. Il faut de plus que la variation observable ait une amplitude suffisamment grande pour qu'elle puisse être utilisée comme mesure différentielle. Nous avons retenu plusieurs tests biochimiques qui traduisent, dans une certaine mesure, l'amplitude des perturbations métaboliques produites dans l'organisme irradié. La variation de l'"indicateur biologique" sera utilisée comme test d'évaluation de l'effet protecteur du produit essayé.

B - CRITERES D'EVALUATION DU DOMMAGE BIOLOGIQUE

L'évaluation du dommage biologique causé par l'action des rayonnements ionisants aux organismes vivants est un problème difficile et fait l'objet, à l'heure actuelle, de nombreux travaux de recherche. Nous passerons en revue un certain nombre de techniques d'étude et de résultats relatifs à l'action des radiations et nous indiquerons les critères que nous avons retenus pour notre travail d'examen de l'action du "Shir-Khecht", en tant que radioprotecteur, à dose sublétale.

1) Critères possibles

Ils sont de divers ordres et font appel aux différentes techniques de la cytologie, de l'histologie, de l'hématologie, de la biochimie, etc...

a) Critères généraux

Un des critères généraux utilisé d'une manière presque systématique est l'étude de la mortalité et de son corollaire la survie (139-156-36-35-102-115). Ce critère ne peut plus être employé lorsque la dose d'irradiation à laquelle est soumis l'organisme vivant considéré est nettement inférieure à celle qui produit la mort.

L'utilisation des courbes de poids est également classique en radiobiologie, qu'il s'agisse du poids total du corps (26) ou du poids de certains organes (101-128-125), elle est moins fréquente dans le domaine de l'étude des radioprotecteurs (91).

Une technique originale préconisée par VITTORIO et WIGHT (153) consiste à injecter aux animaux en cours d'expérimentation, du chromate de sodium marqué au chrome 51. Les auteurs suggèrent que,

avec certaines exceptions, on peut considérer que la variation du taux de ^{51}Cr dans les organes traduit le dommage qu'ont pu subir les organes étudiés ainsi que les processus de restauration qui s'y développent après l'irradiation. Ce test a été employé dans l'étude de l'effet protecteur de la sérotonine chez la souris (153).

b) Critères cytologiques, histologiques et hématologiques

Bien que l'évaluation quantitative des lésions tissulaires et cellulaires soit difficile, les examens cytologiques, histologiques et histochimiques ont été utilisés, en particulier dans l'étude des lésions intestinales et plus généralement des altérations subies par le tube digestif au cours du syndrome gastrointestinal (76-76-88-134-136).

Les examens cytologiques portent le plus souvent sur des cellules isolées ou en culture (108-23-145-148-64-2).

L'index mitotique (17-63), les altérations chromosomiques (38-121-130-121), la fréquence des mutations (73-78) ont été employés comme tests de l'activité radioprotectrice des composés essayés.

Les érythrocytes (21-46), les réticulocytes (43), l'incorporation du fer 59 dans les hématies (117-70-43), les altérations de la moelle osseuse (18-75-67-138) et, d'une manière générale, des systèmes hématopoïétiques et des éléments figurés du sang, ont été les plus utilisés, en radioprotection (89-157-47-100-140-99-25-16).

c) Critères métaboliques et fonctionnels

Le métabolisme de base d'un organe et la respiration cellulaire ont fréquemment servi de test d'étude des substances radioprotectrices (146-149-62-162-154-152).

L'activité fonctionnelle de certaines glandes à sécrétion interne a été également employée. La thyroïde (98-150-151-52-63), les surrénales (14-116) et, le plus souvent, les gonades (68-128-131-87-78-79-80 80-79-44) ont servi de base à ces études.

On peut, peut être, rattacher à ce groupe les lésions ophtalmologiques (142), l'opacité du cristallin (71) et la formation des cataractes (54).

d) Critères biochimiques

Les effets biochimiques pouvant servir d'"indicateurs radiobiologiques" ont fait l'objet de quelques revues générales, en particulier : MARBLE (93), GERBER (49), SMITH (137), LIPKAN (83), RODESCH (124), KUSIN (74).

L'activité de certains enzymes tels que les deshydrogénases, les transaminases, les phosphatases, etc... a fait l'objet d'études particulières (3-26-28-29-59-114-120). L'ATPase (57-15-129-22-143-57), les DNAases (82), la catalase (84), les transaminases (6), les phosphatases (107), des estérases (92), la cholinestérase, entre autres (1), la créatine phosphokinase (7) ont été employés comme tests d'étude des radioprotecteurs chimiques.

Les acides nucléiques (ADN et ARN) et leurs produits de dégradation : nucléotides, thymine, thymidine, acide β aminoisobutyrique, désoxycytidine, pseudouridine, etc... ont été très étudiés, en ce qui concerne l'effet des radiations (37-13-118-137), mais c'est surtout la teneur de certains tissus en acides nucléiques qu'ont recherché les auteurs travaillant sur les radioprotecteurs (11-75-109-155-160-53-113-72-19-51-147-159-31).

L'excrétion urinaire des acides aminés très employée en radiopathologie, surtout en ce qui concerne les irradiations accidentelles (8-55-61-112-122-133), ne semble pas avoir été utilisée en radioprotection chimique.

Par contre, l'excrétion urinaire de l'acide 5-hydroxyindoleacétique catabolite de la sérotonine a servi de test d'étude des radioprotecteurs (32-119-90-39).

L'action sur les protéines (60-4-24-30-50-132), sur le métabolisme lipidique (69) a été utilisée en radioprotection.

Il en est de même des effets sur le métabolisme de l'eau et des électrolytes, en particulier le sodium et le potassium (161-20-162-92).

2) Critères retenus

Nous avons vu au chapitre précédent, les résultats obtenus à partir de l'examen histologique et cytologique des testicules ainsi que la variation du poids total et celle du poids des testicules et poids de la rate en fonction du temps, après l'irradiation.

Dans le but de déterminer la modification de l'effet biologique des radiations provenant de l'utilisation d'un radioprotecteur lorsque la dose absorbée est sublétale, nous avons retenu plusieurs déterminations d'ordre biochimique qui sont le dosage du phosphore total contenu dans les testicules, celui des acides desoxyribonucléiques et des polydésoxyribonucléotides libres de la rate ainsi que l'évaluation quantitative de la variation, en fonction du temps, de l'excrétion urinaire du sodium et du potassium.

Nous exposerons, tout d'abord, les techniques analytiques que nous avons employées, puis nous indiquerons les résultats que l'on obtient, en fonction de l'exposition, en ce qui concerne les indices biochimiques que nous avons choisis, enfin nous étudierons les variations que subissent ces indices lorsque les animaux ont été protégés avant l'irradiation, soit par le "Shir-Khecht", soit par l'AET que nous gardons comme radioprotecteur de référence.

C - TECHNIQUES EXPERIMENTALES

1) Dosage du potassium et du sodium dans les urines

Le sodium et le potassium ont été dosés, simultanément, dans les urines, par photométrie de flamme, à l'aide d'une méthode automatique.

Les échantillons d'urine ne subissent aucune dilution, ni traitement avant le dosage. Ils sont placés dans des godets, sur un plateau distributeur. La quantité d'urine à analyser est prélevée automatiquement dans les godets grâce à une pompe proportionnante qui réalise également une dilution convenable, le diamètre des tubes placés sous les rouleaux de la pompe, déterminant cette dilution (cf figure 22). Une solution sulfurique de nitrate de lithium est utilisée comme étalon interne à la fois pour le potassium et le sodium. Deux cellules photoélectriques placées dans le photomètre de flamme, mesurent le sodium et le potassium d'une part, le lithium d'autre part. Le réglage des sensibilités spectrales des cellules à l'aide de filtres, permet le dosage simultané du sodium et du potassium. Le rapport des tensions de sortie des cellules relatives à la mesure et à l'étalon s'inscrivent sur un enregistreur potentiométrique. L'évaluation quantitative de la valeur des concentrations de sodium et de potassium est obtenue par comparaison de la hauteur des pics de la courbe d'enregistrement avec celles des pics de gammes étalons de sodium et de potassium qui correspondent à des solutions étalons de concentrations convenablement choisies.

2) Dosage du phosphore dans les testicules

La technique employée est totalement automatique

a) Appareillage

Le dispositif d'analyse automatique comprend :

- un échantilloneur-broyeur-dilueur qui réalise le broyage du testicule et sa mise en suspension dans un diluant convenable. Les testicules sont directement placés dans des godets qui se déversent dans le broyeur.

- une pompe à vide de l'échantilloneur qui permet l'évacuation de l'excès de suspension et le rinçage de la chambre de broyage.

- une première pompe proportionnante qui distribue le réactif de minéralisation et l'échantillon à analyser et les introduit dans l'hélice de minéralisation, de plus, elle amène à la sortie de l'hélice, l'eau de dilution.

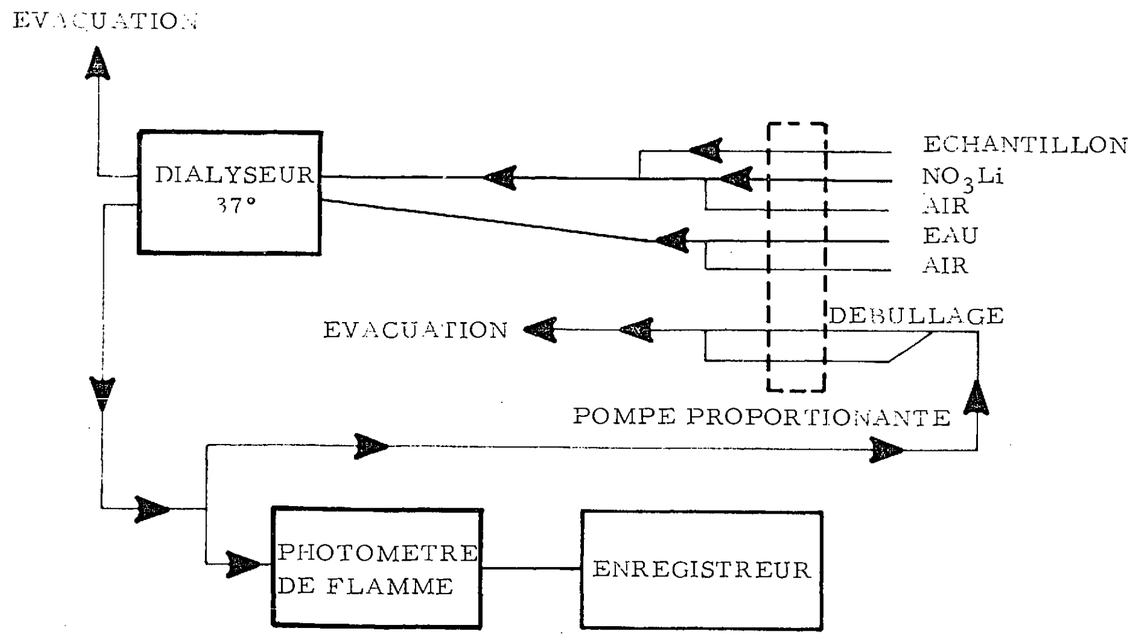


FIGURE n°22

- un minéralisateur qui est constitué par une hélice de verre chauffée par des résistances, cette hélice tourne sur elle-même. Elle conduit peu à peu, le mélange minéralisé vers une chambre d'homogénéisation.
- une pompe à vide du minéralisateur qui évacue l'excès du minéralisat.
- une deuxième pompe proportionnante qui répartit les réactifs du dosage du phosphore minéral et l'échantillon minéralisé.
- un bain marie à 95°C.
- un colorimètre photoélectrique à circulation
- un expanseur d'échelle
- un enregistreur potentiométrique

Le schéma du dispositif analytique est donné par la figure 23.

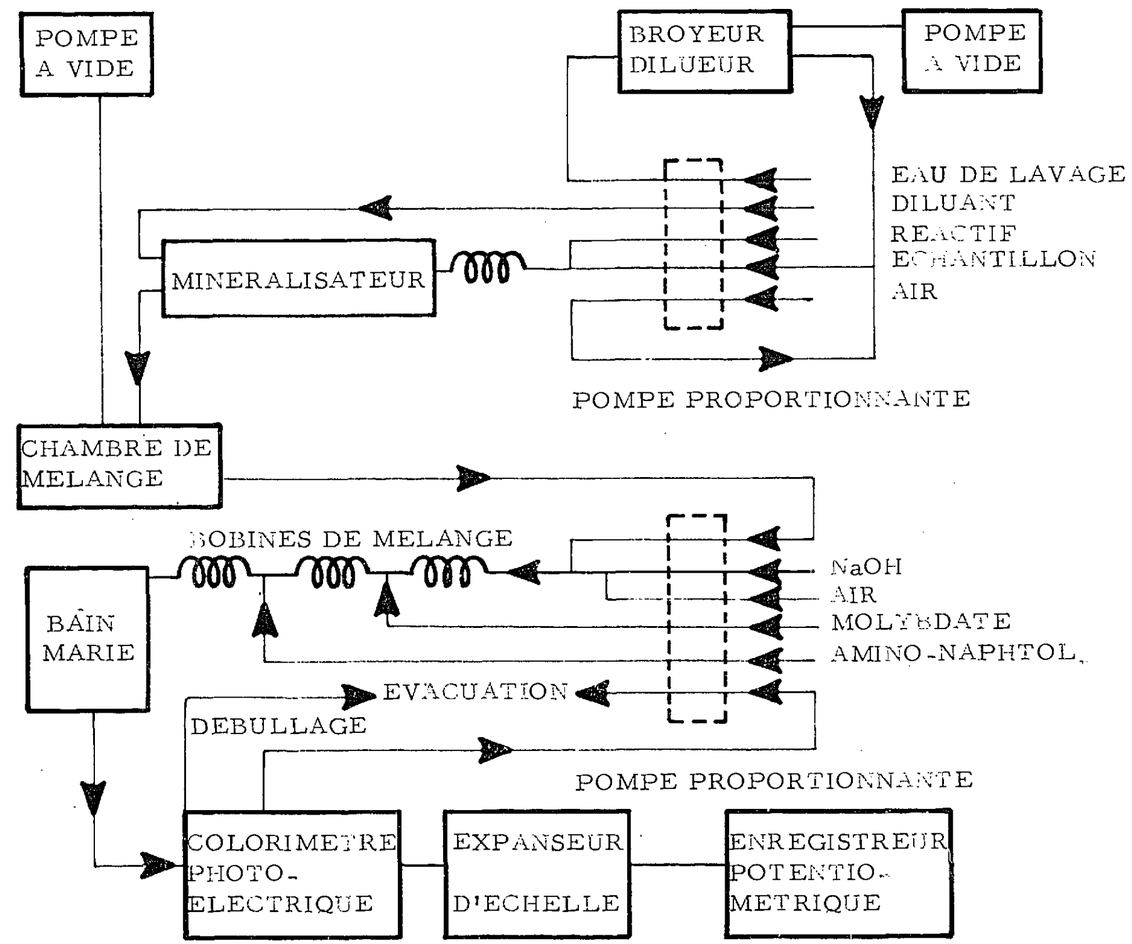


FIGURE n°23

b) Fonctionnement

α) Broyage

Les testicules sont placés dans les godets du plateau distributeur qui tourne à la vitesse de 20 échantillons à l'heure. Un signal provenant d'un programmateur fait tourner le plateau et chaque godet déverse son échantillon dans un entonnoir qui conduit à la chambre de broyage. Un volume déterminé de diluant est projeté par des jets pour nettoyer l'intérieur du godet et les parois de l'entonnoir. Une lame coupante tournant à 10000 tours par minute, met en suspension ou dissout le tissu dans le diluant (dans le cas présent le diluant est de l'eau distillée). L'échantillon homogénéisé est alors aspiré dans le circuit analytique. Pendant cette aspiration, la lame rotative tourne à vitesse réduite pour éviter tout dépot. Entre chaque échantillon, la chambre d'homogénéisation est rincée automatiquement par le diluant pour prévenir toute contamination. Après l'aspiration de l'échantillon, la quantité en excès est évacuée.

Il est nécessaire que les étalons subissent exactement le même traitement que les échantillons. L'étalonnage peut être fait en plaçant dans les godets : soit une solution de phosphore minéral, soit une solution d'un composé phosphoré organique dont la teneur en phosphore est connue, ce qui permet de vérifier la minéralisation.

β) Minéralisation

La suspension d'échantillon segmentée par des bulles d'air est mélangée automatiquement à un réactif minéralisant de formule :

Acide sulfurique d = 1,84	950 ml
Acide perchlorique RP 65 °/o	50 ml
Pentoxyde de vanadium	0,05 g

Le mélange est amené dans l'hélice de minéralisation chauffée par une résistance. L'eau est vaporisée et la minéralisation se fait au cours du déplacement de l'échantillon vers l'extrémité de l'hélice. La solution minéralisée est refroidie et diluée par de l'eau froide, puis aspirée dans une chambre d'homogénéisation. Une partie est pompée dans le circuit analytique de dosage du phosphore, le reste est évacué.

γ) Dosage du phosphore

La solution est neutralisée partiellement par de la soude diluée, puis mélangée aux réactifs de la réaction phosphomolybdique selon la méthode de FISKE et SUBBAROW (45) où l'agent réducteur est l'acide 1-amino 2-naphtol 4-sulfonique (ANS).

Réactif au molybdate sulfurique

Molybdate d'ammonium RP	7,5 g
Acide sulfurique RP d = 1,84	98 g
Eau bidistillée qsp	1000 ml

Réactif à l'ANS

Métabisulfite de sodium (Pyrosulfite de sodium)	109,6 g
Sulfite de sodium anhydre	4 g
ANS	2 g
Eau bidistillée qsp	1000 ml

Le mélange passe dans un bain marie à 95°C. pendant environ 10 minutes, puis arrive dans la cuve à flux continu du colorimètre photoélectrique (filtre à 660 mμ). Le colorimètre est relié à un enregistreur

potentiométrique par l'intermédiaire d'un expanseur d'échelle qui permet d'ajuster la sensibilité. L'évaluation quantitative des quantités de phosphore contenues dans chaque échantillon est faite par comparaison des hauteurs des pics obtenus sur la courbe d'enregistrement et la hauteur de pics correspondant à une gamme étalon de phosphore.

3) Dosage des acides desoxyribonucléiques et des desoxyribonucléotides libres de la rate

a) Extraction et séparation

Les rates des rats sacrifiés sont pesées et broyées dans une solution de Cl Na à 8,2 °/o. Les desoxyribonucléotides libres restent en solution tandis que les desoxyribonucléoprotéines précipitent. Cette méthode de séparation a été employée par SKALKA et MATYASOVA (135). On effectue ensuite une centrifugation à 6000 tours par minute et l'on sépare les PDN libres des DNAprotéines. On acidifie le surnageant (0,2 ml d'acide perchlorique concentré pour les 10 ml de surnageant, ce qui donne une solution environ 0,2 N), les polydésoxyribonucléotides libres, acidoinsolubles, précipitent à leur tour. On centrifuge à 6000 tours par minute, pendant 5 minutes. On jette le surnageant. On obtient deux culots : l'un, insoluble dans le Cl Na à 8,2 °/o qui contient les desoxyribonucléoprotéines, l'autre soluble dans la solution de Cl Na, mais acidoinsoluble qui contient les polydesoxyribonucléotides libres. On ajoute alors aux culots 5 ml d'acide perchlorique à 5 °/o, on remet les précipités en suspension et l'on hydrolyse pendant 30 minutes à 80°C. Il faut agiter pendant la durée de l'hydrolyse. On centrifuge ensuite à 6000 tours par minute pendant 5 minutes et dans les surnageants on dose le dexoxyribose par la réaction de DISCHE à la diphénylamine.

b) Dosage du dexoxyribose

Nous avons effectué ce dosage à l'aide de deux techniques, l'une manuelle, l'autre automatique en utilisant un autoanalyseur.

α) Technique manuelle

A 1 ml de solution contenant du desoxyribose on ajoute 4 ml du réactif à la diphénylamine. On laisse 15 heures à l'obscurité à 20°C. puis on effectue un dosage colorimétrique au spectrophotomètre à 700 mμ. L'étalonnage de l'appareil est réalisé à l'aide d'une gamme étalon de solutions de concentrations en désoxyribose allant de 5 μg à 200 μg dissout dans de l'acide perchlorique à 5 °/o. Le réactif à la diphénylamine qui doit être conservé à l'abri de la lumière, a la composition suivante :

Diphénylamine	1 g
Acide acétique glacial	100 ml
Acide sulfurique à 66°B	2 ml

β) Technique automatique

Elle est basée sur la même réaction. Le circuit analytique est donné par le schéma de la figure 24.

D - RESULTATS EXPERIMENTAUX

1) Diurèse

L'évolution de la diurèse a été suivie après l'irradiation. Les courbes de la figure 25 montrent les différences de pente que l'on obtient en traçant les courbes de diurèse cumulée, en fonction du temps, relatives aux divers groupes d'animaux : irradiés et non irradiés, protégés par le Shir-Khecht ou par l'AET.

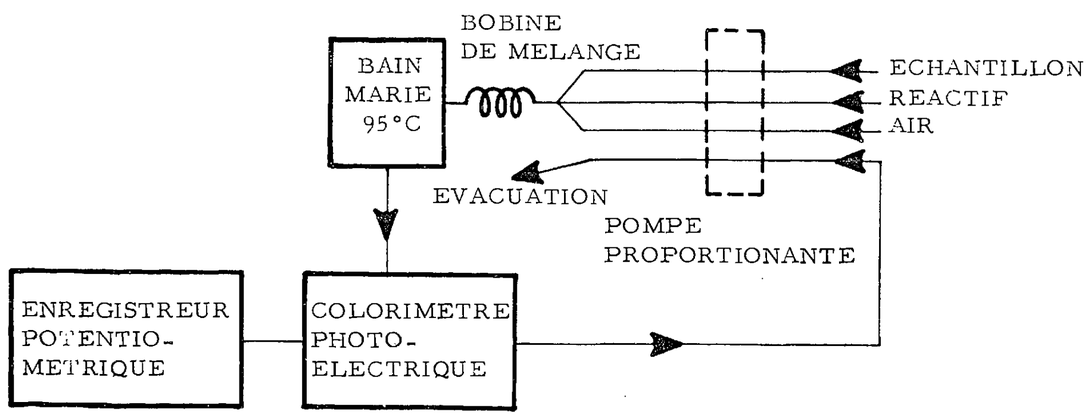


FIGURE n°24

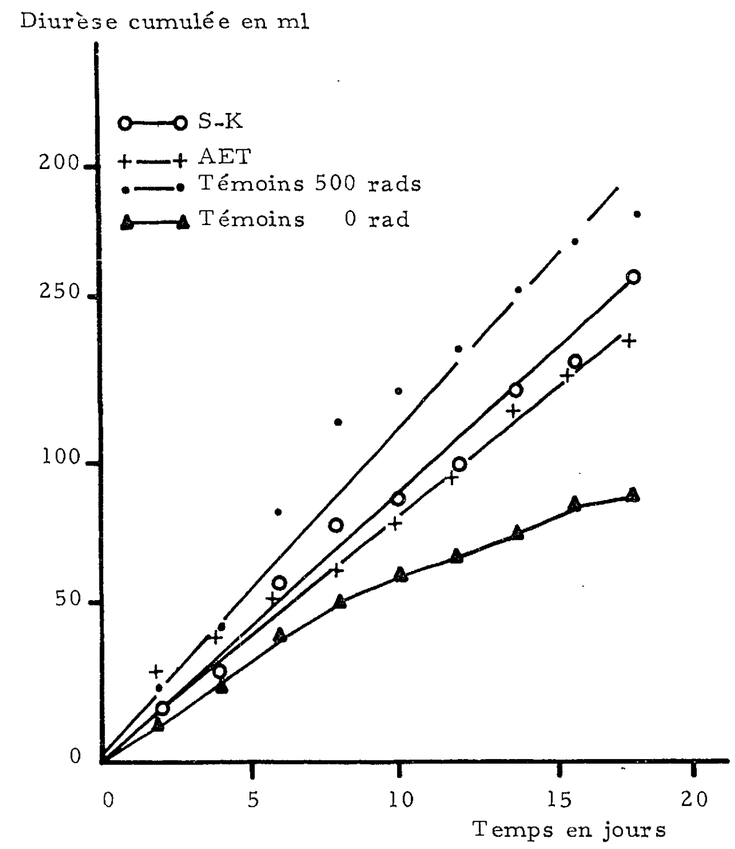


Figure n°25

2) Excrétion urinaire du sodium et du potassium

Au cours d'expérimentations portant sur l'irradiation de rats à dose létale et sublétale (93), l'excrétion urinaire du sodium et du potassium a paru liée à la dose reçue par les animaux. En particulier, si l'on trace les courbes d'excrétion urinaire cumulée en fonction du temps après l'irradiation, on obtient des pentes différentes, plus faibles pour les irradiés que pour les non irradiés. L'utilisation d'un radioprotecteur, si ce dernier est efficace, devrait se traduire par une augmentation de la pente de la courbe d'excrétion cumulée. Un résultat illustrant cette observation a été publié (94). Un essai comparatif effectué avec le "Shir-Khecht" a donné des résultats du même ordre comme le montrent les courbes d'excrétion cumulée de potassium de la figure 26. Le "Shir-Khecht" était utilisé par voie intrapéritonéale, sous forme d'hydrolysat, à raison de 0,5 gramme par kilogramme de poids de l'animal. La dose calculée qu'ont, en principe, absorbée les animaux irradiés des divers groupes était de 500 rads.

On peut noter, après examen de ces courbes :

- La différence de pente nette entre les courbes relatives aux animaux irradiés et non irradiés, le rapport des valeurs numériques des pentes étant de l'ordre de 2.

- La variation également nette de pente que subissent vers le quatrième jour les courbes relatives aux animaux protégés, la pente des courbes, après avoir été voisine de celle des animaux irradiés non protégés, tend à reprendre une valeur proche de la pente des courbes des animaux non irradiés.

Cette expérimentation n'ayant pas été poursuivie au delà de 7 jours, le nombre de points expérimentaux après le 4ème jour, sont en nombre insuffisant pour que l'on puisse accepter ce résultat d'une façon définitive, c'est pourquoi nous avons effectué une expérimentation s'étalant sur 20 jours après l'irradiation.

Nous avons, tout d'abord, tracé les courbes d'excrétion cumulée du potassium correspondant à la même période de temps, soit 7 jours de la première expérimentation pour voir si ces deux séries sont comparables entre elles. (cf figure 27).

Si les quantités de potassium excrétées par jour, sont assez différentes, le rapport des pentes des courbes relatives aux animaux non irradiés et irradiés, est également voisin de 2. Quant aux courbes qui correspondent aux animaux protégés, si celle relative à l'AET a une allure semblable à celle que nous avions déjà obtenue, les courbes relatives au "Shir-Khecht" administré "per os" se situent beaucoup plus près de la courbe des témoins non irradiés.

Si l'on trace les courbes d'excrétion cumulée du potassium relatives à la période s'étalant du 10ème jour au 20ème jour après l'irradiation, on obtient pratiquement des droites dont les pentes ont respectivement pour valeur 1, 50-0, 80-1, 07-1, 22 mEq par jour pour les rats non irradiés et irradiés, les rats protégés par le Shir-Khecht et l'AET (cf figure 28).

Sur les courbes d'excrétion cumulée du sodium, on observe un point d'inflexion vers le 16ème jour, c'est pourquoi nous n'avons représenté sur la figure (29), que les courbes relatives à la période s'étalant du 5ème au 15ème jour. Pendant cette période, les courbes sont pratiquement des droites et les pentes calculées concernant les animaux non protégés non irradiés et irradiés, les animaux protégés par le Shir-Khecht et par l'AET ont respectivement pour valeur 0, 58-0, 41-0, 51 et 0,50.

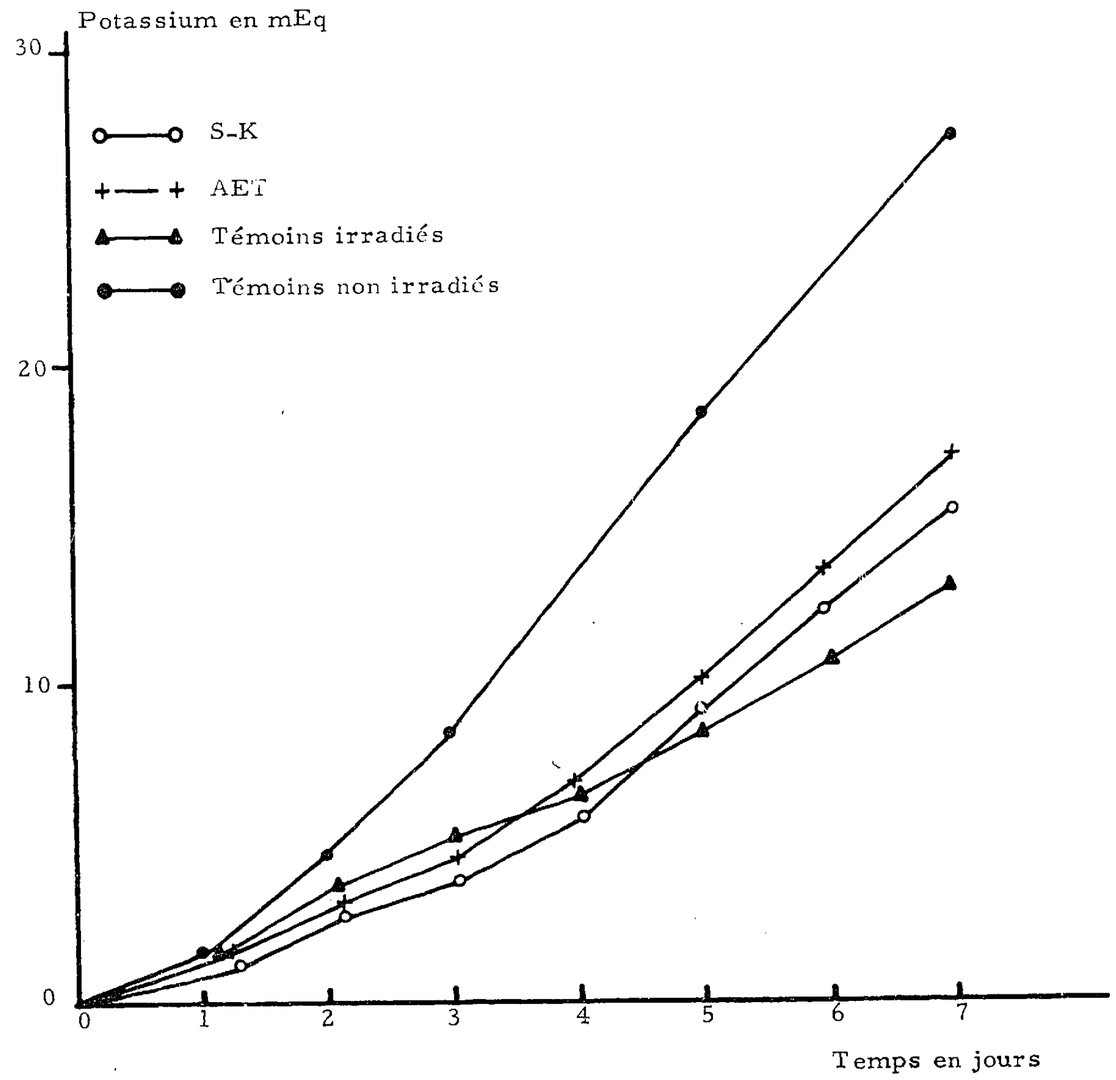


FIGURE n°26

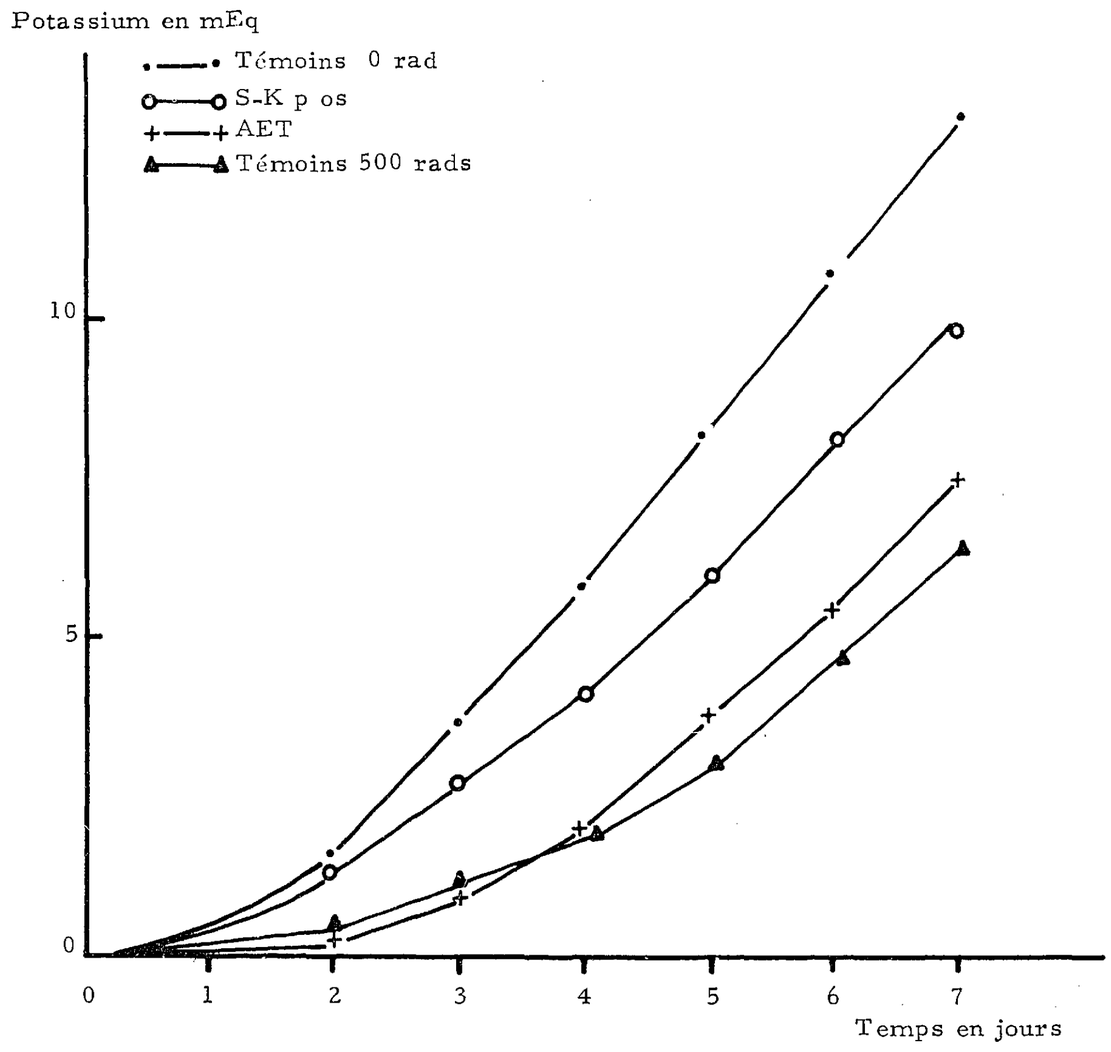


Figure n°27

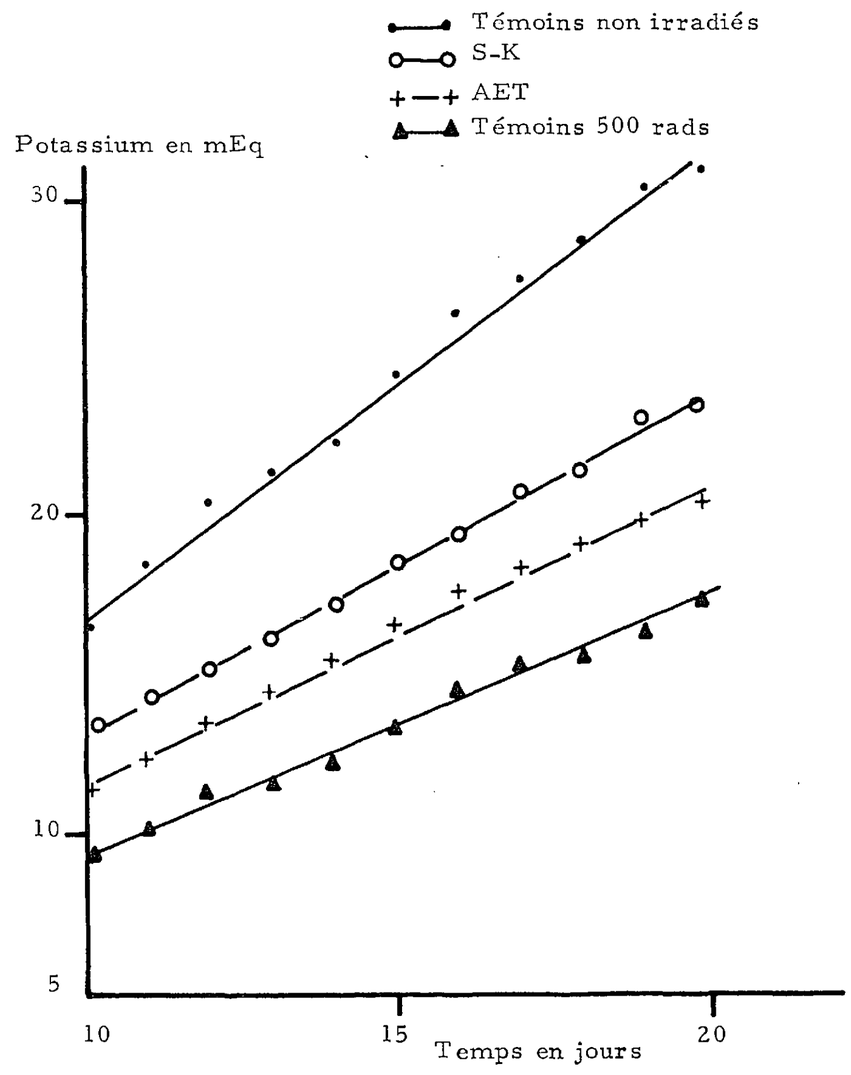


Figure n°28

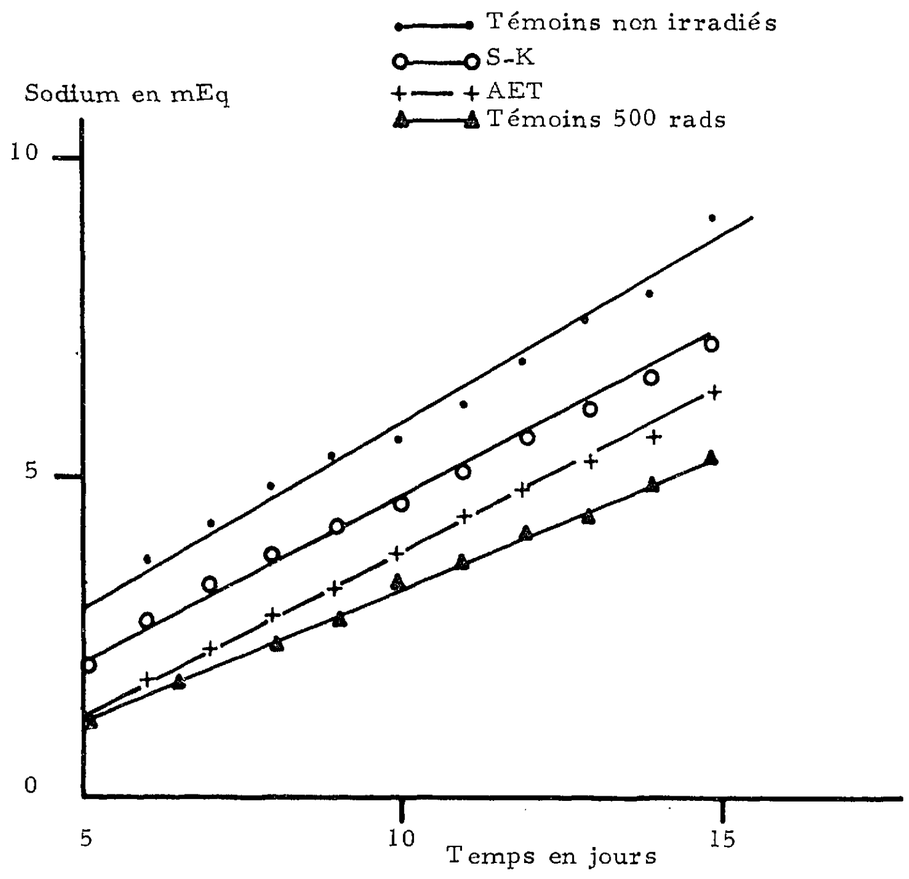


Figure n°29

3) Phosphore testiculaire

La figure 30 montre les courbes de variation du phosphore total contenu dans les testicules des animaux irradiés et non irradiés, ainsi que dans ceux des animaux traités par le Shir-Khècht. Les animaux irradiés ont reçu une dose correspondant à la létalité 100 °/o dans les 30 jours qui suivent l'irradiation (DL 100/30 jours) de façon à déterminer si cette dose permettait d'enregistrer des variations importantes entre les différents groupes.

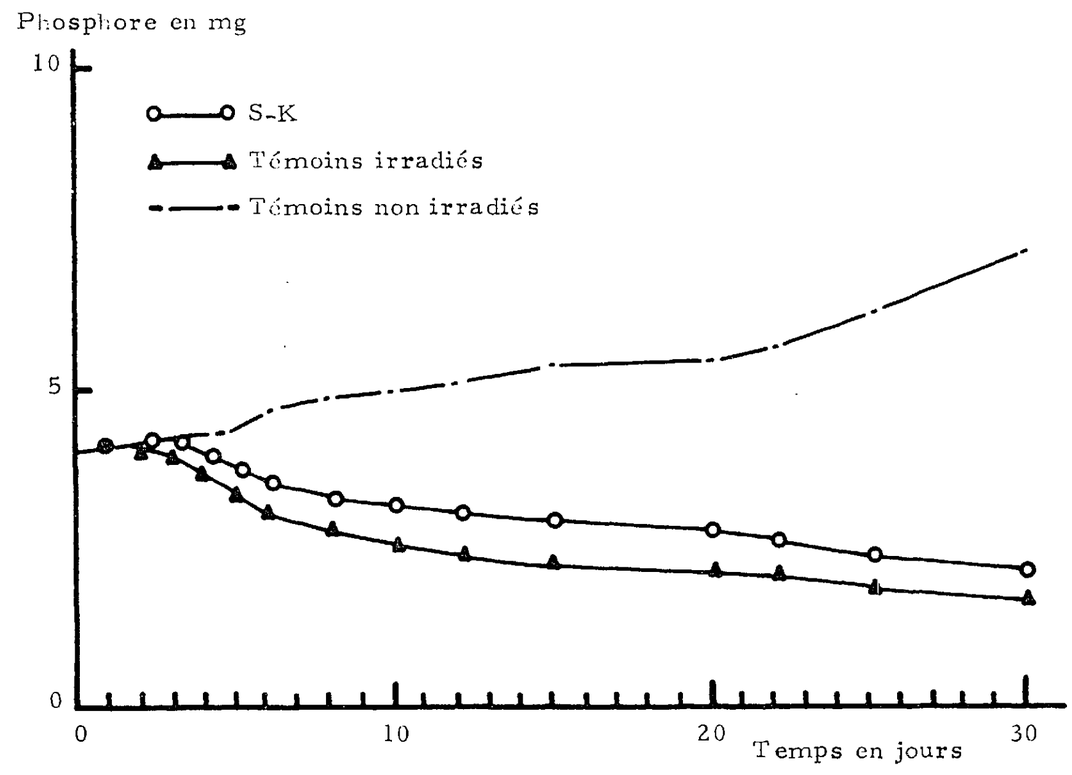


Figure n°30

Bien que la courbe relative aux animaux protégés soit toujours au dessus de celle des animaux non protégés, la différence des ordonnées reste constamment faible.

Si l'on exprime les résultats des teneurs en phosphore, en tenant compte de la variation de poids des testicules en fonction du temps après l'irradiation (cf figure 31), on constate que les courbes sont sensiblement analogues à celles que nous avions obtenues précédemment.

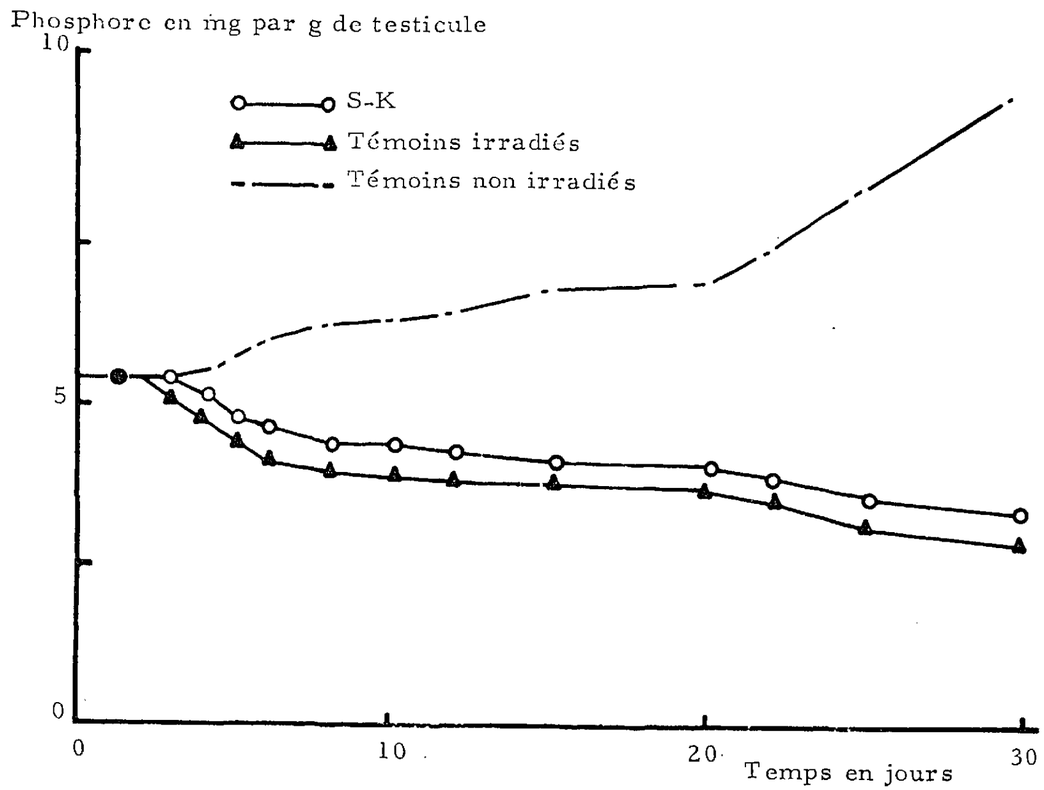


Figure n°31

4) ADN et polydesoxyribonucléotides libres de la rate

L'évolution de la teneur de la rate de rats irradiés à 800 rads, en fonction du temps, an acide desoxyribonucléique (ADN) et en polydesoxyribonucléotides libres (PDRN) est donnée par les courbes des figures 32 et 33. Les résultats sont exprimés en µg de dexoxyribose.

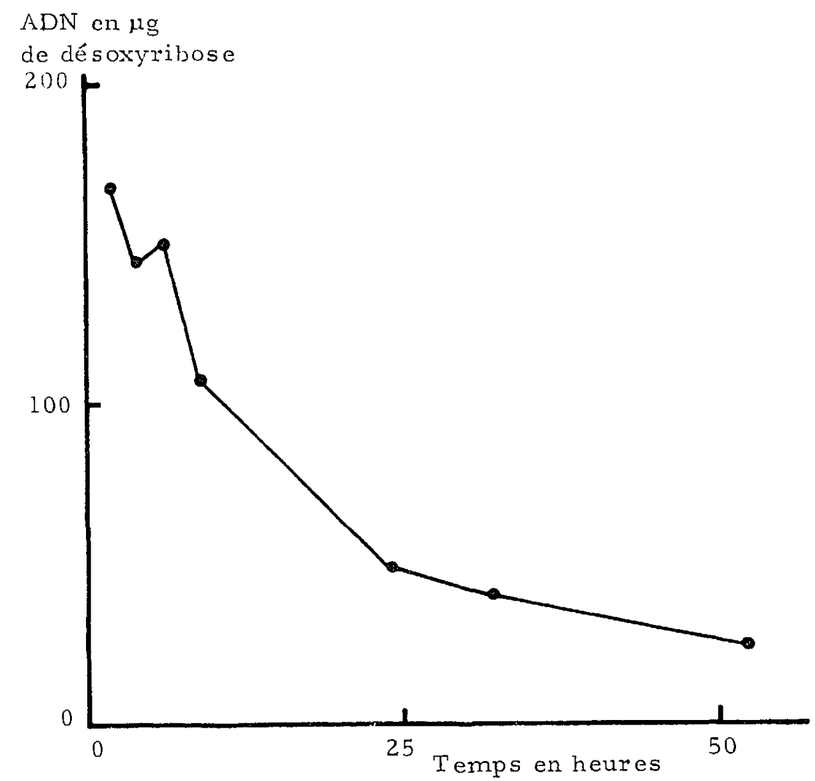


Figure n°32

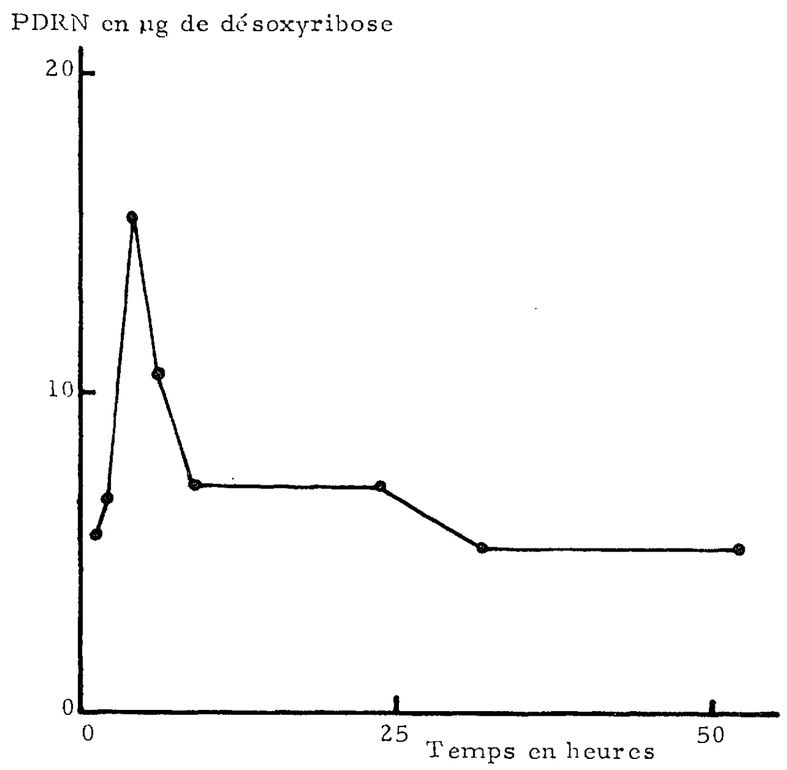


Figure n°33

On peut noter que la teneur de la rate en PDRN varie peu à partir de 10 heures après l'irradiation et étant donné la valeur faible des PDRN par rapport à l'ADN, ce rapport des PDRN à l'ADN variera pratiquement en fonction de l'ADN seul entre 10 et 50 heures après l'irradiation.

Plusieurs groupes d'animaux ont été irradiés à des doses différentes de façon à suivre la variation de la teneur en ADN et PDRN en fonction de la dose. Les animaux ont été tous sacrifiés 48 heures après l'irradiation et les rates immédiatement prélevées. La courbe de la figure 34 montre que la teneur en ADN est de 2 à 4 fois plus faible lorsque la dose absorbée est supérieure à 100 rads. Si l'on compare ce résultat avec celui de l'évolution du poids de la rate (cf figure 13), il n'y a pas de différence sensible entre les deux courbes d'évolution, la concentration en ADN de la rate gardant une valeur pratiquement constante.

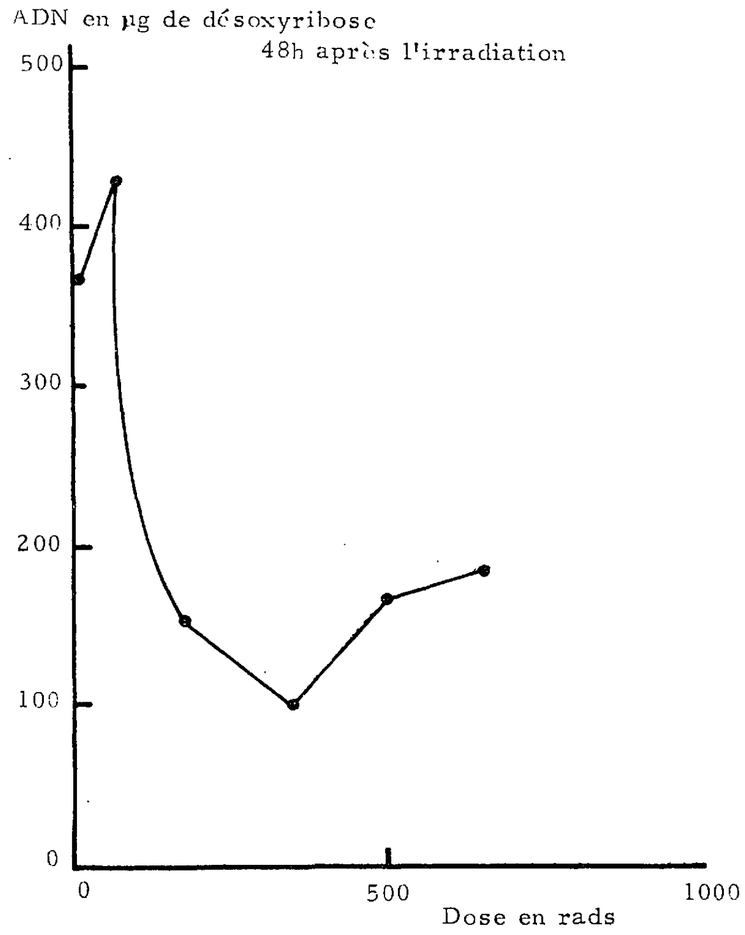


Figure n°34

La courbe de la figure 35 relative aux PDRN met en évidence la faible variation de ces derniers, dans les conditions expérimentales. Si l'on rapporte ces résultats au poids de rate, on peut noter une faible augmentation de la concentration de la rate en polynucléotides.

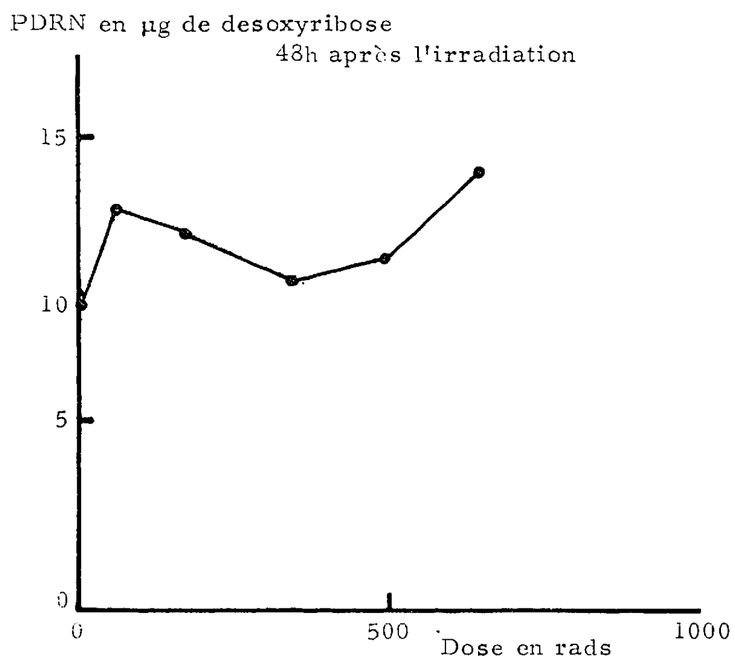


Figure n°35

Un essai réalisé dans les mêmes conditions sur des animaux irradiés à 350 rads protégés ou non par l'AET ou le "Shir-Khecht", a donné les résultats suivants, quant à la teneur en ADN exprimée en µg de désoxyribose ;

Témoins non irradiés	41
Irradiés à 350 rads	12,3
350 rads + AET	34,7
350 rads + Shir-Khecht	33,5

E - CONCLUSION

Notre propos étant d'essayer d'évaluer l'action d'un radioprotecteur à dose sublétale, nous avons été amenés à rechercher les méthodes d'étude utilisables dans ces conditions.

Il faut, bien entendu, que les méthodes retenues soient fidèles et que la variation de l'indicateur suive convenablement la variation de l'exposition, mais il faut surtout que la méthode soit précise et sensible de façon à pouvoir enregistrer des réponses biologiques à des agressions de faible importance. Il reste cependant une inconnue qu'il est très difficile de chiffrer c'est la sensibilité propre de chaque être vivant soumis à l'irradiation. Les méthodes de dosimétrie biologique traduisant le dommage radiobiologique subi, et non pas l'exposition ni la dose absorbée, il est clair que l'on puisse obtenir des résultats différents pour deux animaux irradiés, dans les mêmes conditions, pour une même valeur de l'exposition. Les variations de la réponse individuelle viennent donc s'ajouter aux fluctuations statistiques normales relatives au test considéré et il semble illusoire de vouloir exprimer, à l'aide d'une unité d'exposition ou de dose absorbée, la variation de la réponse biologique de l'organisme irradié et par suite l'effet d'un radioprotecteur. C'est pourquoi nous n'avons pas cherché à calculer les facteurs de réduction de dose éventuellement obtenus au cours des diverses expérimentations que nous avons effectuées.

Nous nous sommes surtout intéressés aux méthodes faisant appel à des techniques biochimiques. L'appréciation des désordres métaboliques produits par l'irradiation est, sans doute, un des critères les plus rationnels pour l'évaluation du dommage radiobiologique. Cette méthode présente, de plus, l'avantage d'orienter la prophylaxie et le traitement puisqu'elle permet de déterminer les variations qui sont à corriger.

Les expérimentations que nous avons effectuées ne sont qu'un essai de ces méthodes, une tentative faite dans le but de voir si elles peuvent réellement remplir le rôle que nous croyons pouvoir leur assigner.

Certaines méthodes concernant des analyses tissulaires (phosphore des testicules, acides nucléiques de la rate....), ne peuvent être effectuées que chez l'animal d'expérience, leur utilisation dans les techniques biologiques d'évaluation de l'activité protectrice des radioprotecteurs chimiques, peut se concevoir, mais elles ne sont pas utilisables, tout au moins dans la pratique courante, chez l'homme. Par contre l'étude des variations des concentrations des métabolites sanguins ou des catabolites urinaires, peut, trouver un champ d'application aussi bien en radioprotection chimique, qu'en radiopathologie humaine.

Les résultats des divers dosages que nous avons réalisés, montrent que, dans tous les cas, il est possible d'apprécier, au point de vue qualitatif, la valeur radioprotectrice d'un composé chimique. Quant au point de vue quantitatif, il ne peut encore être donné avec précision, mais il est vraisemblable de penser que l'étude des variations des indicateurs biochimiques, après irradiation chez l'homme et les animaux d'expérience, permettra dans un avenir proche de déterminer la gravité de l'atteinte, le pronostic, la nature des désordres subis, la nature des désordres corrigés par certaines substances chimiques administrées soit avant, soit après l'irradiation, sans pour cela avoir besoin d'une unité physique pour évaluer la dose de rayonnement.

CONCLUSIONS GENERALES

La recherche de l'éventuelle activité radioprotectrice du "Shir-Khecht", à dose létale et à dose sublétale, que nous avons effectuée chez le rat, par les méthodes classiques (courbes de mortalité, pourcentage de survie, variation de la perte de poids du corps entier et de certains organes...) ainsi qu'à l'aide de techniques d'étude biochimiques, cytologiques et histologiques, nous a permis de mettre en évidence une action protectrice du "Shir-Khecht" dans toutes les expérimentations quelle que soit la dose d'irradiation et quelle que soit la forme sous laquelle le "Shir-Khecht" était utilisé.

Une constatation importante a été faite : à savoir que le "Shir-Khecht" est actif par voie orale, si l'administration du produit est effectuée pendant plusieurs jours avant l'irradiation.

L'emploi des voies orales et intrapéritonéales associées a donné les meilleurs résultats soit 50 % de survie pour un groupe d'animaux irradiés à dose létale.

L'effet protecteur du "Shir-Khecht" à dose sublétale est également manifeste comme l'ont montré les résultats des analyses biochimiques que nous avons effectuées. Toutefois, il ne nous a pas été possible de donner un résultat chiffré de la réduction de dose que l'on obtient car les techniques d'évaluation du dommage biologique ne sont pas encore bien établies. L'utilisation que nous avons faite de ces techniques constitue d'ailleurs une contribution à l'étude des effets biochimiques de l'irradiation.

L'emploi de ces techniques d'ordre biochimique semble une voie d'avenir dans l'étude de l'action des rayonnements ionisants sur les organismes vivants, d'une manière générale, et leur application à l'étude de l'activité des radioprotecteurs chimiques, à dose sublétale surtout, paraît être une méthode de choix. Il serait souhaitable que ces études soient poursuivies à l'aide de méthodes plus élaborées de façon à pouvoir évaluer quantitativement la protection effectivement réalisée. Ces méthodes ont de plus, l'avantage d'expliciter, dans une certaine mesure, les mécanismes d'action et, peut être, d'ouvrir une voie vers la thérapeutique des effets pathologiques de l'irradiation.

Il ne nous a pas été possible de mettre en évidence, à l'aide des résultats des analyses que nous avons effectuées, l'existence d'un composé chimique de structure telle que l'on pourrait lui attribuer (compte tenu de sa concentration dans le Shir-Khecht) la responsabilité de l'effet protecteur.

Il se peut que l'action protectrice du "Shir-Khecht" soit due à l'association de certains composés à action protectrice relativement faible (acides aminés, sucres....), l'association révélant une synergie d'action. L'effet protecteur peut également être dû à un composé chimique connu ou inconnu, que nous n'avons pas identifié, mais il se peut également que l'action protectrice du "Shir-Khecht" ne relève pas des processus d'action généralement admis en particulier vis à vis de la formation des radicaux libres, au stade primaire des effets physicochimiques de l'irradiation. De plus, nous n'avons pu déterminer la cinétique de l'élimination du "Shir-Khecht" après son administration (au rat), ne possédant pas de technique analytique spécifique adéquate. C'est pourquoi l'on peut hypothétiquement penser que le "Shir-Khecht" pourrait agir après l'irradiation, en empêchant certaines modifications pathologiques de se produire en réalisant, en quelque sorte, une thérapeutique symptomatique.

L'analyse complète du "Shir-Khecht", la séparation et l'extraction des divers constituants, l'essai de ces composés dans des conditions analogues à celles que nous avons employées permettront, sans doute, d'obtenir une protection plus efficace.

L'extrapolation à l'homme des résultats obtenus chez le rat est bien difficile. Il faudrait expérimenter le produit chez d'autres espèces animales plus proches de l'homme que le rat. Mais il est un fait capital, c'est que le "Shir-Khecht" ne présente aucune toxicité et que son emploi ne fait courir aucun risque. Il n'en est malheureusement pas de même de la presque totalité des radioprotecteurs qui ont été préconisés jusqu'à ce jour.

Enfin, la mise en évidence d'une protection obtenue, à l'aide d'un produit naturel, non toxique, actif par voie orale orientera, peut être, vers des voies nouvelles les recherches actuellement entreprises dans le domaine des radioprotecteurs chimiques.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ADOLPHE M., CHEYMOL J., DEYSSON G. et CHABRIER P.
Progr. Bioch. Pharmacol., 1, 501, 1965

2 - ADOLPHE M., CHEYMOL J., DEYSSON G., CHABRIER P. et HEITZ F.
Roentgen Europe, 8, 55, 1964

3 - ALBAUM H.G.
Rad. Res., 12, 186, 1960

4 - ALBERS H., HARTH H. et GENIUS G.B.
Strahlentherapie, 118, 4, 605, 1962

5 - ALEXANDER P., BACQ M.Z., COUSENS S.F., FOX M., HERVE A. et LASAR J.
Rad. Res., 2, 292, 1955

6 - ALMONTE T.J., BARNES J.H., BAUTISTA S.C., DE LA CRUZ B., LANSANGAN L. et PINEDA P.A.
Int. J. Rad. Biol., 9, 1, 34, 1964

7 - ANDERSON D.R.
Biophys., 81, 390, 1959

8 - ANDREWS G.A., SITTERSON G.W., KRETCHMAR A.L. et BRUCER M.
In Diagnostic et Traitement des Radiolésions Aigües O.M.S.
Genève, 1960

9 - BACQ Z.M.
Triangle, V, 1, 2, 1961

10 - BACQ Z.M. et ALEXANDER P.
Fundamentals of Radiobiology, Pergamon Press, Londres, 1955

11 - BALABUKHOVA V.S. et ISUPOVA L.S.
Medicinska Ja. Radiologi Ja, VI, 8, 39, 1961

12 - BARRON E.
in Symposium on Radiobiology, Wiley and Sons, New York, 1952

13 - BERRY H.K., SAENGER E.L., PERRY H., FRIEDMAN B.I., KEREIAKES J.G. et SCHEEL C.
Science, 142, 396, 1963

14 - BETZ E.H.
Contribution à l'étude du syndrome endocrinien. Masson, Paris, 1956

15 - BIRZU S., CAPILNA S., STEFAN M., GHIZARIE E. et BADESCU A.
Strahlentherapie, 132, 4, 623, 1967

16 - BORN G.V.R.
J. Physiol., 190, 2, 273, 1967

17 - BOSE P. et BOSE A.
Acta Radiol., 56, 5, 1961

18 - BRAHMA S.K., BOSE A. et BOSE S.
Nucleus, V, 2, 143, 1962

19 - BROWN P.E.
Nature, 213, 5074, 363, 1967

20 - BURDIN K.S., KOLTUNOR Y.B. et PARKHOMENKO I.M.
Radiobiologya, 5, 922, 1963

21 - BURLAKOVA E.V., CONCHARENKO E.N. et KODRYASHON Y.B.
Naucnye Doklady Vyssej Skoly Biol., 1, 99, 1961

22 - CAPALNA S., STAFAN M. et GHIZARIE E.
N.S.A. 20 20517, 1966

23 - CHATTERJEE R. et BOSE A.
Experimental Research, 27, 1, 168, 1962

24 - CHATTERJEE R. et BOSE P.
Naturwissenschaften, 49, 18, 1962

25 - COLCLOUGH N.V. et HANNA C.
Arch. Int. Pharmacol. et de Thér., 143, 1-2, 8, 1963

26 - CONARD R.A.
Am. J. Physiol., 170, 418, 1952

27 - COSTACHEL O., FURNICA M. et DRAGON V.
N.S.A. 20, 9, 14293, 1966

28 - DALRYMPLE G.V., LINDSAY I.R. et GHIDONI J.J.
USAF School of Aerospace Medicine. Brooks Air Force Base. Texas. 1965

29 - DALRYMPLE G.V., LINDSAY I.R., GHIDONI C.B. et KUNDEL H.L.
J.Nucl. Med., 6, 8, 588, 1965

30 - DAMYANONOVICH S., SZABOLCS M. et SZATI I.
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 25, 307, 1964

31 - DANYSZ A.
Progr. Biochim. Pharmacol., 1, 461, 1965

32 - DEANOVIC Z., SUPEK Z. et RANDIC M.
Int. J. Rad. Biol., 7, 1, 1, 1963

33 - DIXON W.J. et MOOD A.M.
J.Am. Stat. Assoc., 43, 241, 109, 1948

34 - DOHERTY D.G., BURNETT W.T. et SCHAPIRA R.
Rad. Res., 7, 13, 1957

35 - DOULL J. et PLZAK V. et BROIS S.J.
A survey of compounds for radiation protection. Washington, 1962

36 - DOULL J., PLZAK V. et ROOT M.
Quaterly Progress report 40, 107, 1961

37 - DRAHOVSKY D., WINKLER A. et SKODA J.
Nature, 201, 411, 1964

38 - DUBININ N.P. et ARSENEVA KALJAEVA E.S.
Akademya nauki, 1960. N.S.A., 12 A, 15460, 1961

39 - DZHARAKYAN T.K., GOLUBENTSEV D.A. et VLADIMIROV V.G.
Radiabiologya, 5, 415, 1965

40 - EBRAHIMZADEH H.
Congrès de Physiol. Végét., Strasbourg, 1967

41 - EHLING V.H. et DOHERTY D.G.
P.S.E.B.M., 110, 3, 493, 1962

42 - ELDJARN L. et PHIL A.
Progress in Radiobiology, Edimbourg, 1958

43 - ELTGEN D., KOCK R. et LANGENDORFF H.
Strahlentherapie, 114, 1, 118, 1961

44 - FEDOROV B.A.
Med. Radiol. 10, 12, 42, 1965

45 - FISKE C.H. et SUBBAROW K.
J. Biol. Chem., 66, 375, 1925

46 - FLEMMING K.
Strahlentherapie, 116, 3, 404, 1961

47 - FLEMMING K.
Strahlentherapie, 120, 3, 456, 1963

48 - FRICKE M.
in Symposium Quant. Biol., Coldspring, Harson, 2, 241, 1934

49 - GERBER G.B., KNUT R., TRAELNES D.V. et ALTMAS K.I.
Clin. Chim. Acta, 9, 183, 1965

50 - GRAIEVSKAIA B.
Tr. Inst. Genet. Akord. Nauk SSSR, 32, 94, 1965

51 - GOUTIER R., MAISIN J.R., LEONARA A. et LAMBIET M.
Rev. Franc. d'Et. Clin. et Biol., XI, 10, 1001, 1966

52 - GREIG W.R., CROOKS J. et MAC GREGOR A.G.
Brit. J. Radiol., 38, 445, 72, 1965

53 - GROS C., MANDEL P. et RODESCH J.
Compt. Rend. Soc. Biol., CXLVII, 1279, 1953

54 - HANNA C. et BRIEN J.E.
Arch. Int. Pharmacol. et Ther., 142, 1-2, 198, 1963

55 - HEMPELMANN L.H.
In Diagnostic et Traitement des Radiolésions Aigües O.M.S. Genève. 1964

56 - HERVE E. et BACQ Z.M.
C.R. Soc. Biol., 143, 881, 1949

57 - HIETBRINK B.E., RAYMUND A.B., ZINS G.R. et DUBOIS K.P.
Toxicology and applied pharmacology, 3, 3, 267, 1961

58 - HROE J.
J. Biol. Chem., 107, 15, 1934

59 - HUGHES L.B.
Report LA 2167, 1, 1958

60 - ISUPOVA L.S. et YAKOLEV V.G.
Medicinska Ja Radiologiya, V, 9, 42, 1960

61 - JAMMET H.P.
in Diagnostic et Traitement des Radiolésions Aigües, Genève, 1960

62 - JARMONENKO S.P.
Radiobiologiya, 1, 6, 903, 1961

63 - JARMONENKO S.P. et SHMAKOVA N.L.
Radiobiologiya, IIV, 3, 453, 1963

64 - KELLEY G.G. et WHEELER G.R.
Rad. Res., XIV, 2, 174, 1961

65 - KHUSSAR
Bull. Biol. de la France et de la Belgique, 96, 3, 362, 1962

66 - KIMBALL A.W., BURNETT W.T. et DOHERTY D.G.
Rad. Res. , 7, 1, 1, 1957

67 - KINOSITA R., NOVOTNY A., SHIKATA T. et WEIN J.
III Int. Kongr. für Chemotherapie, Stuttgart, 1963

68 - KIRMANN J.M.
Bull. Biol. de la France et de la Belgique, 96, 3, 365, 1962

69 - KLEMM J. et PABST H.W.
Strahlentherapie, 123, 3, 438, 1967

70 - KOLOUSEK J. et GYORGYIS S.
Neoplasma, 13, 3, 289, 1966

71 - KROKOWSKI E. et TIBURTIUS H.
Strahlentherapie, 119, 2, 300, 1961

72 - KRUGLYAKOVA K.E., NIKOLAEVA N.V., ZAKHAROVAN A. et EMANUEL N.M.
Compt. Rend. Acad. Sciences de l'URSS, 157, 4, 979, 1964

73 - KUNKEL H.A., KAMM P. et HOHNE G.
Strahlentherapie, 114, 1, 94, 1961

74 - KUSIN A.M.
Radiation Biochemistry. Israel Program for Scientific Translation. Jerusalem, 1964

75 - LANGENDORFF H. et HAGEN U.
Strahlentherapie, 117, 3, 321, 1962

76 - LATARJET R. et LARTIGUE O.
Compt. Rend. Séances Acad. Sciences, 252, 948, 1961

77 - LEA D.E.
Actions of radiation on living celles. Cambridge, 1955

78 - LEONARD A. et MAISIN J.R.
Compt. Rend. Soc. Biol. 157, 4, 409, 1963

79 - LEONARD A. et MAISIN J.R.
Compt. Rend. Soc. Biol., 157, 2, 913, 1963

80 - LEONARD A. et MAISIN J.R.
Compt. Rend. Soc. Biol., 8, 9, 923, 1962

81 - LEFORT M.
La Chimie Nucléaire, Dunod, Paris, 1965

82 - LIBIKOVA N.
Vop. Med. Khim., 11, 5, 65, 1965

83 - LIPKAN N.F.
Elementy Radiatsionniy Biologii i Biokhimii, 45, Kiev, 1963

84 - LOHMANN W. et MOSSA J.
J. Nucl. Med., 7, 11, 878, 1966

85 - LOISELEUR J.
Techniques de Laboratoire, 1, 1, 689, Masson, Paris, 1963

86 - LOWRY N.H., ROSEWBROUGH A.L., FARR R.J. et RANDAU J.
Biol. Chem., 193, 265, 1951

87 - LUNING K.G., FROLEN H. et NELSON A.
Rad. Res., 14, 8, 813, 1961

88 - MAISIN J.R.
Strahlentherapie, 51, 250, 1962

89 - MAISIN J.R. et DOHERTY D.G.
Rad. Res., 19, 474, 1963

90 - MAISIN J.R., LEONARD A. et HUGON J.
J.Nat. Can. Inst., 35, 1, 103, 1965

91 - MAISIN J.R., NOVELLI G.D. et DOHERTY D.G.
Int. J. Rad. Biol., 11, 3, 281, 1960

92 - MAISIN J.R. et POPP R.A.
Am. J. of Physiol., 199, 2, 251, 1960

93 - MARBLE G.
Radioprotection, 2, 1, 55, 1967

94 - MARBLE G.
1er Congrès Int. de l'I.R.P.A., mémoire 4, Rome, 1966

95 - MARBLE G., BOULANGER P. et DUNEAU M.
Bull. Inf. Scient. Techn. du C.E.A., 113, 73, 1967

96 - MARBLE G. et BREUIL L.
Rapport Technique n° 3, C.R.S.S.A. Radiobiol., 1966

97 - MARBLE G. et ROUHANIZADEH N.
Radioprotection, 2, 3, 195, 1967

98 - MARUYAMA Y.
Rad. Res., XIX, 3, 538, 1963

99 - MELCHING H.J.
Strahlentherapie, 55, 11, 24, 1964

100 - MELVILLE G.S., BENSON R.E., LEFFINGWELL T.P. et HARRISON G.W.
USAF School of Aviation Medicine, Report 61-3-, 1961

101 - MEWISSEN D.J. et MALAISE
Radiobiologica Latina, 4, 1, 9, 1961

102 - MKRTCHYAN R.G.
Isvestija Akad. Nauk Arman. S.S.R. Biol. XIV, 3, 55, 1962

103 - MOGHADAM S.
Thèse Pharmacie, Paris, 1930

104 - MOKRASCH L.C.
J. Biol. Chim., 208, 55, 1954

105 - MORALES F.M., OSBALER A.J., MARTIN H.L. et CHAMLERS R.W.
Biochem. Biophys., 72, 54, 1957

106 - NELSON N.L.
J. Biol. Chem., 153, 375, 1944

107 - NUVOLONE U.
Radiobiol. Latina, 2, 4, 281, 1959

108 - NUZHDIN N., DOZORCEVA R.L. et SAMOKHVALOVA N.S.
Zhurmal Abscéj Biol., 4, 261, 1963

109 - ORMEROD M.G. et ALEXANDER P.
Nature, 4, 812, 290, 1962

110 - PARSA A.
Flore d'Iran. Téhéran. Iran

111 - PATT H.M., TYREE E.B., STRAUBE R.L. et SMITH D.E.
Science, 110, 213, 1949

112 - PENDIC B.
in Diagnostic et Traitement des Radiolésions Aigües. Genève. 1964

113 - PETROVA M.D. et SHALNOV M.I.
Radiobiologya, 6, 1, 1966. A.E.C. Tr 6770, 159, 1966

114 - PIERUCCI O.
Rad. Res. Soc. Twelth Annual Meeting, Miami Beach, Florida, 1964

115 - PLZAK V., ROOT M. et DOULL J.
Quaterly Progress Report n° 40, 41, 1961

116 - POLIKARPOVA
A.E.C. Tr. 6603, 183, 1965

117 - PRASAD K.N. et OSBORNE J.W.
Int. J. Rad. Biol., 7, 3, 245, 1963

118 - PRIZEK J., ARIENT M., DIENSTBIER Z. et SKODA J.
Proc. Sec. U.N. Conf. on the Peac. Use of At. En., P2498, 1958

119 - RANDIC M. et SUPEK Z.
Int. J. Rad. Biol., 4, 2, 151, 1961

120 - RAPPOPORT D.A. et FRITZ R.D.
Rad. Res., 21, 5, 15, 1964

121 - RAY-CHAUDHURI S.P., CHAUDHURI J.P. et CHATTERJEE S.
Int. J. Rad. Biol., 5, 6, 591, 1962

122 - RDOJICIC B., HADJUKOVIC S. et ANTIC M.
In Diagnostic et Traitement des Radiolésions Aigües. Genève. 1964

123 - RISSE O.
Strahlentherapie, 34, 581, 1929

124 - RODESCH J. et MANDEL P.
Compt. Rend. Soc. Biol., 415, 1955

125 - RODESCH J.
Thèse d'agrégation, Université libre de Bruxelles, 1966

126 - RODESCH J.
Thèse Doctorat ès Sciences, Strasbourg, 1961

127 - ROUHANIZADEH N.
Thèse D.E.A., Fac. Sciences. Téhéran. Iran. 1964

128 - SAVKOVIC N.V. et HAJDUROVIC S.I.
Rev. Franc. d'Et. Clin. et Biol., 5, 5, 478, 1960

129 - SCAIFE J.F.
Com. J. Biochem., 44, 319, 1966

130 - SHAO W., WANG T. et CHANG H.
Sci. Sinica (Peking), 13, 1523, 1964

131 - SHAPIRO N.I., CHUDINOVSKAJA G.A. et PANKOVA N.V.
Zurnal Abscej Biol., 21, 6, 430, 1960

132 - SHIMAZU F. et TAPEL A.L.
Science, 143, 369, 1964

133 - SHIPMAN T.L.
In Diagnostic et Traitement des Radiolésions Aigües. Genève. 1964

134 - SCHWARTZ E.E. et SHAPIRO
Radiol., 77, 1, 83, 1961

135 - SKALKA M., MATYASOVA J. et SOSKA J.
in Biol. Eff. of Ioniz. Rad. Mol. Lev., A.I.E.A., Vienne, 1962

136 - SMIRNOVA I.B.
Radiobiologiya, 11, 5, 768, 1962

137 - SMITH H., BATES T.H. et SMITH C.J.
Int. J. Rad. Biol., 8, 3, 263, 1964

138 - SMITH L.H. et VOS O.
Int. J. Rad. Biol., 5, 5, 461, 1962

139 - SMOLIAR
Compt. Rend. Soc. Biol., 156, 6, 1202, 1962

140 - SOEDA M.
III Int. Kongr. für Chemotherapié. Stuttgart, 1963

141 - SPACKMAN D.A., STEIN W.H. et MOORE S.
Anal. Chem., 30, 1190, 1958

142 - STRAUB W., GRAUL H., RUTHER W., HUNDESNAGEN H., NEUBAUER M., JACOBI K.W. et XRUGER H.
Progr. Biochem. Pharmacol., I, 447, 1965

143 - TARDIFF R.G. et DUBOIS K.P.
USAF School of Aviation Medicine, Report AD 629311, 1966

144 - TARUSOV B.N.
Principles of the Biological Effects of Radiation, Moscou, 1955

145 - TOLKACHEVA E.N. et BREGADZE N.
Radiobiologiya, II, 6, 907, 1962

146 - TRINCHER K.S. et MOZZHUKHIN A.S.
Radiobiologiya, III, 4, 626, 1963

147 - VANDERGOTEN R. et GOUTIER R.
Int. J. Rad. Biol., II, 5, 449, 1966

148 - VAN DER MEER C., VALKENBURG P.W. et REMMELTS M.
Nature, 189, 4, 764, 1961

149 - VASER
Medicinska Ja Radiol. Ja, VII, 7, 57, 1962

150 - VITTORIO P.V. et ALLEN M.J.
Rad. Res., XIII, 266, 1960

151 - VITTORIO P.V., ALLEN M.J. et SMALL D.L.
Rad. Res., XV, 5, 625, 1961

152 - VITTORIO P.V. et SPENCE W.P.
Canadian J. of Biochem. and Phys., 38, 8, 819, 1960

153 - VITTORIO P.V. et WIGHT E.W.
Canadian J. of Biochem. and Phys., 4, 1525, 1963

154 - VITTORIO P.V. et SPENCE W.P.
Canadian J. of Biochem. and Phys., 38, 819, 1960

155 - VLADIMIROV V.G.
Voprosy Medicinskaya Khimi, VI, 5, 501, 1960

156 - WANG R.I.H. et KERIAKES
Acta Radiol., 58, 2, 99, 1962

157 - WEISS L.
Int. J. Rad. Biol., 3, 285, 1961

158 - WEISS J.
Nature, 157, 184, 1946

159 - WICART L. et VENDRELY Y.C.
C.R. Acad. Sc. Paris, 264, 6, D, 857, 1967

160 - YAMANATO G.
Nippon Igaku Hashasen Gakkai Zasshi, XIX, 1003, 1959

161 - ZSEBOK Z.B. et PETRANYI G.
Strahlentherapie, 125, 449, 1964

162 - ZETTUNJAN K.A., KONSTANTINOVA M.M. et SEMENOV L.F.
Radiobiologiya, II, 4, 616, 1962

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I

DOMMAGE RADIOBIOLOGIQUE ET PROTECTION CHIMIQUE 3

A - INTRODUCTION 3

B - MECANISMES PRIMAIRES DE L'ACTION DES RAYONNEMENTS IONISANTS SUR LES ORGANISMES VIVANTS 3

C - MECANISMES POSSIBLES DE L'ACTION DES SUBSTANCES RADIOPROTECTRICES 5

D - STRUCTURES CHIMIQUES POSSEDANT UN POUVOIR RADIOPROTECTEUR 6

E - METHODES D'ETUDE DES RADIOPROTECTEURS 9

1) Expérimentation biologique 9

2) Essai sur modèle 10

F - CONCLUSION 11

CHAPITRE II

LE "SHIR-KHECHT" 13

A - ORIGINE BOTANIQUE DU "SHIR-KHECHT" 13

B - DESCRIPTION ET PROPRIETES DU "SHIR-KHECHT" 13

C - COMPOSITION CHIMIQUE DU "SHIR-KHECHT" 13

1) Résultats de l'analyse de MOGHADAM 14

2) Recherches personnelles relatives à l'analyse du "Shir-Khecht" 14

a) Dosage des protéines totales 14

b) Dosage des acides aminés 14

c) Recherche et dosage des sucres 16

d) Teneur en eau 17

D - CONCLUSION 17

CHAPITRE III

ACTION PROTECTRICE DU "SHIR-KHECHT" SUR LE RAT IRRADIE A DOSE LETALE 19

Pages

A - INTRODUCTION 19
B - CONDITIONS EXPERIMENTALES 19
1) Animaux 19
2) Irradiation 20
3) Administration du "Shir-Khecht" 21
4) Techniques histologiques 21
C - COURBES DE SURVIE 21
1) Essai à 650 rads du produit brut bouilli 21
2) Essai à l'hydrolysat par voie intrapéritonéale 22
3) Essai du "Shir-Khecht" après dialyse 26
a) Essai par voie intrapéritonéale 26
b) Essai par voie orale 27
c) Essai combiné 28
4) Essai des fractions alcoolosolubles et insolubles 28
D - ESSAIS COMPARATIFS AVEC L'A.E.T. 29
1) Examen toxicologique préliminaire 29
2) Courbes de survie 29
3) Essai de l'association Shir-Khecht - AET 30
E - COURBES DE POIDS 31
1) Poids total du corps 31
2) Poids des testicules 31
3) Poids de la rate 34
F - ETUDE HISTOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE DES TESTICULES 36
1) Spermatogonies 36
2) Autres types cellulaires de l'epithelium séminal 43
3) Les cellules de LEYDIG 44
G - CONCLUSION 44

CHAPITRE IV

ACTION PROTECTRICE DU "SHIR-KHECHT" SUR LE RAT IRRADIE A DOSE SUBLETALE. ESSAI D'EVALUATION BIOCHIMIQUE DE LA PROTECTION 45
A - INTRODUCTION 45
B - CRITERES D'EVALUATION DU DOMMAGE BIOLOGIQUE 45
1) Critères possibles 45
a) Critères généraux 45

Pages

b) Critères cytologiques, histologiques et hématologiques 46
c) Critères métaboliques et fonctionnels 46
d) Critères biochimiques 46
2) Critères retenus 47
C - TECHNIQUES EXPERIMENTALES 47
1) Dosage du potassium et du sodium dans les urines 47
2) Dosage du phosphore dans les testicules 47
a) Appareillage 47
b) Fonctionnement 50
3) Dosage des acides désoxyribonucléiques et des désoxyribonucléotides libres de la rate 51
a) Extraction et séparation 51
b) Dosage du désoxyribose 51
D - RESULTATS EXPERIMENTAUX 51
1) Diurèse 51
2) Excrétion urinaire du sodium et du potassium 54
3) Phosphore testiculaire 59
4) ADN et polydésoxyribonucléotides libres de la rate 61
E - CONCLUSION 65

CONCLUSIONS GENERALES 67

BIBLIOGRAPHIE 69

TABLE DES MATIERES 77

FIN